



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

***Detoxificación de
insecticidas en triatominos:
un enfoque transcriptómico***

Tesista: Traverso, Lucila María

Directora: Ons, Sheila

Codirector: Latorre Estivalis, Jose Manuel

Año: 2019

La Enfermedad de Chagas afecta a millones de personas en Argentina y Latinoamérica. Se considera que el control vectorial de los insectos triatominos que la transmiten es el método más efectivo para controlarla. Sin embargo, el surgimiento de focos de resistencia a insecticidas en *Triatoma infestans* constituye un obstáculo en la ecorregión del Gran Chaco, donde 1 de cada 16 personas se encuentra infectada.

El estudio de las causas de resistencia a insecticidas resulta importante para lograr un correcto manejo del vector. Se han hallado mutaciones en el sitio de acción de los insecticidas piretroides (el canal de sodio dependiente de voltaje presente en membranas de las células excitables) que explican en buena parte la resistencia. Además, se ha observado que la estructura cuticular y el rol de algunas enzimas detoxificativas de estos insectos podrían contribuir al fenómeno. Sin embargo, es poco lo que se conoce sobre la respuesta transcriptómica global de estos insectos frente a la intoxicación.

Teniendo en cuenta las desventajas de los insecticidas neurotóxicos, se ha planteado la necesidad de desarrollar insecticidas de nueva generación que sean específicos para el organismo que se desea controlar, con un bajo impacto en la salud humana y el medio ambiente. Los neuropéptidos, moléculas clave para la regulación de diversos procesos fisiológicos en insectos, podrían ofrecer nuevos blancos para el diseño de estos insecticidas.

Por todo lo expuesto, conocer la secuencia de los genes y su nivel de expresión constituye el primer paso para iniciar estudios moleculares y funcionales. Las tecnologías de secuenciación de nueva generación, en complemento con técnicas moleculares tales como el silenciamiento génico por ARN de interferencia (ARNi) ofrecen herramientas que permiten brindar información valiosa sobre la función génica.

En este trabajo de Tesis se propuso realizar un análisis comparativo del repertorio de las principales superfamilias de enzimas detoxificativas de insectos (Citocromos P450, Carboxil/Colinesterasas y Glutación Transferasas) presentes en los transcriptomas de *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata* y *Triatoma pallidipennis*, así como en el genoma de *Rhodnius prolixus*. Asimismo, se exploró la expresión de estos genes en diferentes tejidos provenientes de bases de datos transcriptómicas disponibles. Se hallaron características distintivas en estas superfamilias en triatominos que podrían impactar en la respuesta a los

tóxicos. Por otra parte, se identificaron candidatos interesantes a estudiar en relación a los fenómenos detoxificativos.

Por otra parte, se realizaron búsquedas de las secuencias de neuropéptidos presentes en los transcriptomas de *Triatoma* spp., a fin de analizarlas comparativamente con las de otros insectos. Como resultado, se observó una conservación estructural de algunas familias de neuropéptidos, mientras que en otros se evidenciaron variaciones incluso dentro de la subfamilia Triatominae.

Con el fin de conocer la respuesta transcriptómica global en *T. infestans* causada por la intoxicación con el piretroide deltametrina, se realizó un análisis de expresión diferencial mediante la técnica *RNA-seq*. El análisis de los resultados evidenció modulación significativa de transcritos involucrados en procesos tales como desarrollo post-embrionario, metabolismo, organización del citoesqueleto, transporte y señalización celular, estrés oxidativo, inmunidad, cutícula y sistema sensorial y cognitivo.

Por último, se evaluó la contribución del neuropéptido *ITG-like* a la respuesta a la intoxicación con deltametrina en *R. prolixus*, utilizando la técnica de ARNi. Los resultados apuntaron a un rol de este neuropéptido en la respuesta a deltametrina.

En conjunto, mediante la aplicación de análisis genómicos, transcriptómicos, filogenéticos y moleculares se obtuvo información novedosa que permite ampliar las fronteras del conocimiento en el marco de la respuesta detoxificativa en triatomíneos. Asimismo, a partir de los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis podrán plantearse nuevas hipótesis en pos de profundizar el conocimiento sobre las causas genéticas subyacentes al fenómeno de resistencia a insecticidas.

Palabras Clave: Resistencia a insecticidas, enzimas detoxificativas, neuropéptidos, filogenia, RNA-Seq, ARN de interferencia, piretroides.

Agradecimientos

Este trabajo fue posible gracias al apoyo recibido de muchas personas de las que estoy rodeada y por las que me siento muy afortunada.

A mis directores de tesis. A Sheila, mi directora, por su motivación, optimismo y las tantas oportunidades ofrecidas. Por la confianza y por estar siempre presente, respondiendo todo tipo de consultas en cualquier momento. A Jose, por la ayuda constante y desinteresada. Por los largos debates científicos que me ayudan siempre a mejorar un poco más. Por haberme alentado siempre a continuar.

A mis compañeros del CREG. Sin dudas, este camino tendría muchas menos risas sin ustedes. Siempre dispuestos a ayudar, debatir e intercambiar ideas, sin importar de qué se trate, en las buenas y en las malas. Con ellos aprendí gran parte de lo que se hoy en materia científica, pero también muchas cosas más. A Naty y a Ivi, un agradecimiento especial por todo. Son incontables los momentos compartidos. Gracias por enseñarme tantas cosas. Por escucharme y acompañarme. Por pasar tantas horas juntas todos los días y aún así tener siempre algo de que charlar. Su amistad fue un pilar fundamental en este camino recorrido.

A Michiel y a Dulce, por hacerme sentir como en casa en Leuven.

Agradezco a toda mi gente de Junín por acompañarme. A mi familia y a mis amigas por compartir mis alegrías y mis tristezas a pesar de la distancia. A Isi y a Magui por brindarme el amor más puro que existe. A Miguel, por escucharme a lo largo de todos estos años y animarme a seguir haciendo lo que me gusta a pesar de las dificultades. Tu apoyo incondicional es invaluable.

Por último, quiero agradecer a CONICET por la beca que me dio la posibilidad de realizar esta Tesis. A la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP) por el lugar de trabajo ofrecido. A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por brindar los recursos necesarios para la investigación científica. A los colaboradores de los trabajos científicos publicados. Al Dr. Gastón Mougabure Cueto, por la provisión de insectos y su excelente predisposición. Al Dr. Gabriel Fernandes, por la colaboración científica con el análisis de datos. A Fausto Gonçalves, por la ayuda brindada con los recursos informáticos.

Introducción general	9
1. La enfermedad de Chagas	10
1.1 Descripción	10
1.2 Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> y fases de la enfermedad de Chagas	10
1.3 Epidemiología	11
1.4 Insectos vectores de <i>T. cruzi</i>	11
1.4.1 Taxonomía	12
1.4.2 Biología	12
1.4.3 Hábitat y distribución geográfica	12
1.5 Estrategias de control vectorial	14
1.5.1 Control químico de insectos triatominos	15
1.5.2 Fallas en las estrategias de control del vector	16
2. Metabolismo de xenobióticos y fases de biotransformación	16
2.1 Resistencia a insecticidas	17
2.1.1 Tipos de resistencia a insecticidas	18
2.1.2 Resistencia a insecticidas en triatominos	20
3. Impacto de las tecnologías de secuenciación de nueva generación en el área de entomología molecular	22
3.1 La secuenciación de genomas y transcriptomas	22
3.2 Secuenciación de nueva generación y su impacto en el campo de la entomología médica	23
3.2.1 Estudios genómicos y transcriptómicos en triatominos	23
3.3 Herramientas transcriptómicas y moleculares para el estudio de la detoxificación en insectos	24
Hipótesis general	27
Objetivos generales	27
Materiales y métodos	28
1. Búsqueda de secuencias en bases de datos transcriptómicas, cuantificación de la expresión y análisis de secuencias resultantes	29
1.1 Bases de datos utilizadas	29
1.1.1 Transcriptomas normalizados de <i>Triatoma infestans</i> , <i>Triatoma dimidiata</i> y <i>Triatoma pallidipennis</i> .	29
1.1.2 Transcriptoma de glándulas salivales de <i>T. infestans</i>	29
1.1.3 Transcriptomas de antenas de <i>R. prolixus</i>	29

1.1.4 Transcriptomas de sistema nervioso de <i>R. prolixus</i>	30
1.1.5 Transcriptomas de diferentes tejidos de <i>R. prolixus</i>	30
1.2 Cuantificación de la expresión génica en transcriptomas	30
1.2.1 Mapeo de lecturas	30
1.3 Identificación de los miembros de las superfamilias proteicas involucradas en la respuesta a insecticidas en el genoma de <i>R. prolixus</i> y en transcriptomas normalizados de <i>Triatoma</i> spp.	31
1.4 Análisis filogenéticos	31
2. Identificación de neuropéptidos y análisis estructural	32
3. El transcriptoma de <i>T. infestans</i>	32
3.1 Preparación de muestras y secuenciación	32
3.2 Ensamblado del transcriptoma y evaluación de calidad	33
3.2.1 Evaluación de calidad de lecturas y limpieza de adaptadores	33
3.2.2 Ensamblado <i>de novo</i>	33
3.3.3 Evaluación de calidad del transcriptoma obtenido	34
3.3.4 Obtención de marcos de lectura	34
3.3.5 Anotación del transcriptoma	35
3.3 Mapeo de las lecturas al transcriptoma ensamblado y análisis estadístico de los resultados	36
3.4 Análisis de enriquecimiento funcional de genes diferencialmente expresados	37
4. Caracterización del neuropéptido ITG-like de <i>R. prolixus</i>	37
4.1 Insectos	37
4.2 Microdissección de tejidos	37
4.3 Extracción de ARN y generación de cDNA	38
4.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADNc (RT-PCR)	38
4.5 Generación de ARN doble cadena (ARNdc)	38
4.6 Inyección de ARNdc	39
4.7 PCR cuantitativa en tiempo real	40
5. Ensayos fisiológicos	41
5.1 Ingesta de sangre	41
5.2 Análisis de excreción	41
5.3 Ensayo de cópula	41
5.4 Registro de oviposición	41
5.5 Topicación con deltametrina y registro de mortalidad	42
6. Análisis estadístico	42
6.1 Pruebas de T	42
6.2 Prueba de Mantel-Cox	43
Capítulo 1: Enzimas detoxificativas de xenobióticos en triatominos	44
1.1 Introducción	45

1.1.1 Citocromos P450	45
1.1.1.1 Clado mitocondrial y CYP2	46
1.1.1.2 Clado CYP3	46
1.1.1.3 Clado CYP4	46
1.1.2 Carboxil/Colinesterasas	47
1.1.3 Glutación Transferasas	47
1.2 Hipótesis	49
1.3 Objetivos específicos	49
1.4 Resumen de la metodología utilizada	49
1.5 Resultados y discusión	50
1.5.1 Citocromos P450	50
1.5.1.1 CYP2 y clado mitocondrial	51
1.5.1.2 El clado CYP3	52
1.5.1.3 El clado CYP4	54
1.5.2 Carboxil/colinesterasas	56
1.5.2.1 Clase de procesamiento de hormonas y feromonas	57
1.5.2.2 Clase relacionada a neuro/desarrollo	58
1.5.3 Glutación Transferasas	61
1.5.3.1 GSTs de la clase Delta y Epsilon	61
1.5.3.2 GSTs de la clase Sigma	63
1.5.3.3 GSTs de la clase Omega	64
1.5.3.4 GSTs de las clases Zeta y Theta	64
1.5.3.5 GSTs microsomales	65
1.5 Conclusiones	65
Capítulo 2: Análisis del neuropeptidoma de triatominos	67
2.1 Introducción	68
2.1.1 Estructura de los neuropéptidos	68
2.1.2 Sistema neuroendocrino de triatominos	69
2.1.3 Potencial de los neuropéptidos como moléculas blanco para el control de insectos perjudiciales	72
2.2 Hipótesis	74
2.3 Objetivos específicos	74
2.4 Resumen de la metodología utilizada	74
2.5 Resultados y discusión	75
2.5.1 Neuropéptidos involucrados en la diuresis y antidiuresis	75
2.5.2 Neuropéptidos involucrados en el desarrollo post-embrionario	77
2.5.3 Neuropéptidos RF-amida	78

2.5.4 Neuropéptidos involucrados en el metabolismo energético	79
2.5.5 Alatostatinas	79
2.5.6 Proctolinas	80
2.5.7 Neuropéptidos con función desconocida	81
2.5.8 Neuropéptidos no detectados en triatominos	83
2.6 Conclusiones	84
Capítulo 3: Análisis transcriptómico de la intoxicación con deltametrina en	85
<i>T. infestans</i>	85
3.1 Introducción	86
3.1.1 Análisis cuantitativo de transcriptomas	86
3.1.2 RNA-seq como método de estudio de la respuesta a la intoxicación con insecticidas	89
3.2 Hipótesis	90
3.3 Objetivos específicos	90
3.4 Resumen de la metodología utilizada	90
3.5 Resultados y discusión	91
3.5.1 Secuenciación y ensamblado	91
3.5.2 Anotación funcional del transcriptoma generado	99
3.5.3 Caracterización de la secuencia del canal de sodio dependiente de voltaje	103
3.5.4 Análisis de expresión diferencial	104
3.5.4.1 Análisis de la calidad de las réplicas	104
3.5.4.2 Análisis de expresión diferencial	105
3.5.4.3 Análisis global de los transcritos diferencialmente expresados	108
3.5.4.4 Análisis de transcritos diferencialmente expresados que no forman parte de los procesos enriquecidos	115
3.6 Conclusiones	124
Capítulo 4: Análisis funcional del neuropéptido ITG-like en <i>R. prolixus</i>	125
4.1 Introducción	126
4.1.1 El neuropéptido ITG-like	126
4.1.2 La técnica de ARN de interferencia	127
4.1.2.1 Mecanismo de acción del ARNi	127
4.1.2.2 ARN de interferencia como método de estudio de la función génica	128
4.1.2.3 Uso del ARNi como estrategia de control vectorial	128
4.1.3 <i>R. prolixus</i> como modelo de estudio de la fisiología de insectos	129
4.2 Hipótesis	130
4.3 Objetivos específicos	130

4.4 Resumen de la metodología utilizada	130
4.5 Resultados y discusión	131
4.5.1 Patrón de expresión del neuropéptido ITG-like en diferentes tejidos de <i>R. prolixus</i>	131
4.5.2 Rol del neuropéptido <i>RhoprITG-like</i> en funciones fisiológicas clave	132
4.5.2.1 Ingesta de sangre, excreción postprandial y muda	132
4.5.2.2 Cópula y oviposición	133
4.5.3 Rol de ITG-like en la supervivencia de <i>R. prolixus</i> tras la topicación con deltametrina	134
4.5 Conclusiones	138
Discusión general	139
Anexo I: Material Suplementario	144
Anexo II: Detalle de protocolos utilizados	172
Anexo III: Abreviaturas	178
Anexo IV: Glosario	181
Bibliografía	183

Introducción general

1. La enfermedad de Chagas

1.1 Descripción

La enfermedad de Chagas, también conocida como Tripanosomiasis americana, es una enfermedad parasitaria causada por el protozooario *Trypanosoma cruzi*. Los insectos de la subfamilia Triatominae son los vectores de este parásito, que es transmitido a seres humanos y a más de 150 especies de animales domésticos y salvajes. Las formas no vectoriales de contagio tienen lugar a través de la transmisión vertical, la donación de sangre y/o órganos por parte de pacientes infectados y más raramente a través de la ingesta de alimentos o líquidos que contienen el parásito (Rassi *et al.* 2010). Si bien los hallazgos paleo parasitológicos indican que la enfermedad afecta a los humanos desde hace al menos 9000 años (Aufderheide *et al.* 2004), fue descrita por primera vez por Carlos Chagas a principios de 1900 (Chagas 1909). Se estima que alrededor de 8 millones de personas en el mundo se encuentran infectadas, aunque la mayor cantidad de casos se concentran en América Latina, donde tiene lugar la transmisión vectorial (OPS 2006a).

Según estimaciones realizadas por la Organización Mundial de la Salud, el Chagas es la enfermedad parasitaria más importante en la región de las Américas, con alrededor de 8000 muertes al año y con una carga 5,5 veces mayor que la Malaria (medida en términos de años de vida ajustados por discapacidad por causa específica) (OMS 2016). En América Latina el control del insecto vector es el método más útil para prevenir la enfermedad, mientras que el diagnóstico de mujeres embarazadas y el testeo de los bancos de sangre constituyen acciones esenciales para prevenir la transmisión vertical y por donantes (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>).

1.2 Ciclo de vida de *T. cruzi* y fases de la enfermedad de Chagas

El ciclo de vida del parásito comienza cuando el insecto triatomino ingiere tripomastigotes de la sangre de un mamífero infectado. Estos se transforman en epimastigotes en el intestino del vector y migran al recto para diferenciarse en tripomastigotes metacíclicos, que son excretados junto con las heces. Los tripomastigotes metacíclicos ingresan por la herida producida por la picadura o por la mucosa intacta del mamífero e invaden diversos tipos de células. Los tripomastigotes se diferencian a la forma de amastigote intracelular en el citoplasma, que se replica con un tiempo de duplicación de

aproximadamente 12 horas por el lapso de 4-5 días. Al final de este período, los amastigotes se transforman en tripomastigotes y la célula del hospedador se rompe liberándolos a la circulación, lo cual permite que los parásitos circulantes puedan invadir otras células e iniciar nuevos ciclos replicativos. Los parásitos circulantes también pueden infectar nuevos insectos que se alimenten del hospedador (Brener 1971; Tyler & Engman 2001; Rassi *et al.* 2010).

La fase inicial de la enfermedad de Chagas en el humano dura de 4 a 8 semanas, mientras que la fase crónica persiste de por vida (Dias 1984; Laranja *et al.* 1956; OMS 2002). La fase aguda puede presentarse asintomática o con episodios de fiebre. Los síntomas aparecen de una a dos semanas después del contacto con el triatomino infectado. Estos síntomas pueden tardar meses en aparecer si el contagio fue a través de una transfusión sanguínea. El tratamiento con drogas antiparasitarias pueden curar la infección aguda y prevenir las manifestaciones crónicas (Rassi & Luquetti 1992; Pinto *et al.* 2009). Un porcentaje bajo de los casos pueden acabar en la muerte de la persona en la fase aguda debido a miocarditis o meningoencefalitis severas, pero alrededor del 90% se resuelven espontáneamente. De ellos, el 30-40% desarrollará, entre los 10 y 30 años después de la infección inicial, alguna forma crónica de la enfermedad (cardíaca, digestiva o ambas). Existen algunos casos de progresión directa desde la fase aguda a la forma clínica de la enfermedad (Dias 1995).

1.3 Epidemiología

El Gran Chaco, una ecorregión que abarca 1,3 millones de km² de Argentina, Paraguay y Bolivia, ha experimentado una degradación acelerada del ecosistema y altos niveles de pobreza (Bucher & Huszar 1999). Las viviendas construidas de adobe y paja, típicas de zonas rurales, brindan numerosas posibilidades de refugios para triatominos. Por estas y otras razones, el Gran Chaco es una zona hiperendémica para enfermedades desatendidas. En el caso de la enfermedad de Chagas, se estima que 1 cada 16 personas se encuentra infectada (OPS 2006a; Nature 2010).

De acuerdo a datos recientes de la Organización Panamericana de la Salud, 21 países deben considerarse endémicos la la enfermedad de Chagas en América, con una prevalencia general de 1.448 cada 100.000 habitantes y cerca de 8 millones de individuos infectados. En los países endémicos, se estima que entre 60 y 80 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad (OPS 2006a).

1.4 Insectos vectores de *T. cruzi*

1.4.1 Taxonomía

Los triatominos pertenecen a la clase Insecta, orden Hemiptera, familia Reduviidae y subfamilia Triatominae (Lent & Wygodzinsky 1979). Esta subfamilia está compuesta por 147 especies existentes y 2 para las que únicamente se dispone de restos fósiles. A pesar de que algunas especies no fueron encontradas en hábitats domésticos o infectadas con *T. cruzi*, todos los triatominos se consideran potenciales vectores de la enfermedad. Las especies asignadas a la subfamilia Triatominae se dividen actualmente en cinco tribus: Aberproseniini, Bolboderini, Cavernicolini, Rhodniini y Triatomini (Lent & Wygodzinsky 1979; Galvão *et al.* 2003; Schofield & Galvão 2009; Galvão & Justi 2015).

1.4.2 Biología

El ciclo de vida de un triatomo comprende el huevo, cinco estadios larvales y el adulto. Los huevos son operculados y blancos o grisáceos en el momento de la postura. En muchas especies este color se mantiene durante el desarrollo, pero en otras se vuelve rosado y finalmente rojizo. La eclosión se produce entre los 10 a 40 días tras la postura del huevo y las larvas apenas eclosionadas son de un color rosado que se va oscureciendo con el endurecimiento progresivo de la cutícula. Transcurridos dos a tres días luego de la eclosión son capaces de alimentarse. En promedio, la duración del ciclo de vida es de algunos meses hasta 2 años, pudiendo el adulto sobrepasar los 2 años de vida dependiendo de la especie (Lent & Wygodzinsky 1979).

Los triatominos son hematofagos obligados, y esta característica los convierte en el único vector de parasitosis humana que es hematófago en la totalidad de sus estadios de desarrollo así como en sus dos sexos. Los triatominos raramente vuelan y pueden pasar meses sin ingerir sangre. Su actividad se ve reducida en los momentos más fríos del año (Lent & Wygodzinsky 1979).

1.4.3 Hábitat y distribución geográfica

Las poblaciones de triatominos pueden clasificarse en selváticas y domésticas, con una categoría intermedia de peridomésticas. Las condiciones que convierten a un vector potencial en un vector efectivo de la enfermedad de Chagas en humanos son: adaptación a

viviendas humanas, alto grado de antropofilia, corto lapso de tiempo entre la ingesta de sangre y la defecación y distribución geográfica amplia (Lent & Wygodzinsky 1979).

En Sudamérica, los vectores de Chagas pueden dividirse en tres grupos ecológicos de acuerdo a su distribución: Cono Sur, Andinos y Amazónicos. El Cono Sur incluye regiones de Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay, donde el vector principal es *Triatoma infestans* (Dias 2007). *Triatoma sordida* es un vector secundario importante en Paraguay, Bolivia, norte de Argentina y sur de Brasil, mientras que los vectores *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata* y *Panstrongylus megistus* poseen una fuerte tendencia a colonizar hábitats domésticos en partes de Brasil (Figura 1) (Guhl 2017). El vector más significativo en la región de los Andes (que incluye partes de Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela) es *Rhodnius prolixus*, mientras que *Triatoma dimidiata* está implicada en la transmisión en Colombia y Ecuador (Guhl 2017) (Figura 1). *Rhodnius ecuadoriensis* es un vector importante en Ecuador y norte de Perú (Abad-Franch *et al.* 2002; Cuba Cuba *et al.* 2002) (Figura 1). En la región amazónica (que se extiende en gran parte del noroeste de Brasil, Guyanas, norte de Bolivia, este de Perú y Ecuador, y sur de Colombia y Venezuela) no existe adaptación vectorial a viviendas humanas en términos generales. Sin embargo, la deforestación y el establecimiento de poblaciones humanas que redujeron la presencia de mamíferos salvajes ha incrementado el contacto entre humanos y vectores. Se ha descrito la presencia de poblaciones de triatomíneos incluyendo *Triatoma maculata*, *Panstrongylus geniculatus*, *Panstrongylus herreri* y *Rhodnius stali* en lugares domésticos y peridomésticos de diferentes países y existe riesgo de ocupación de poblaciones domésticas como *T. infestans*, *T. dimidiata* y *R. prolixus* (Aguilar *et al.* 2007; Coura & Junqueira 2012).

En América Central (desde el centro de México hasta Costa Rica) las campañas antivectoriales han llevado a una disminución de la población del vector doméstico e introducido *Rhodnius prolixus* (Hashimoto & Schofield 2012), dejando como vector principal a *Triatoma dimidiata*, con la excepción de Panamá, donde predomina *Rhodnius pallescens* (Ponce 2007; Zeledón *et al.* 2007).

En América del Norte se han encontrado 40 especies de triatomíneos, de las cuales 8 se comparten entre Estados Unidos y México, 4 se encuentran sólo en Estados Unidos y 28 sólo en México (Ibarra-Cerdeña *et al.* 2009). En México, las especies responsables de la mayor parte de la transmisión vectorial se asocian a viviendas humanas y son *Triatoma barberi*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma gerstaeckeri*, *Triatoma longipennis*, *Triatoma mazzotti*, *Triatoma mexicana*, *Triatoma pallidipennis*, *Triatoma phyllosoma* y *Triatoma picturata* (Cruz-Reyes & Pickering-López 2006). En Estados Unidos, la transmisión vectorial no es

frecuente y la mayor preocupación está constituida por las reacciones anafilácticas a las picaduras (Klotz *et al.* 2010).

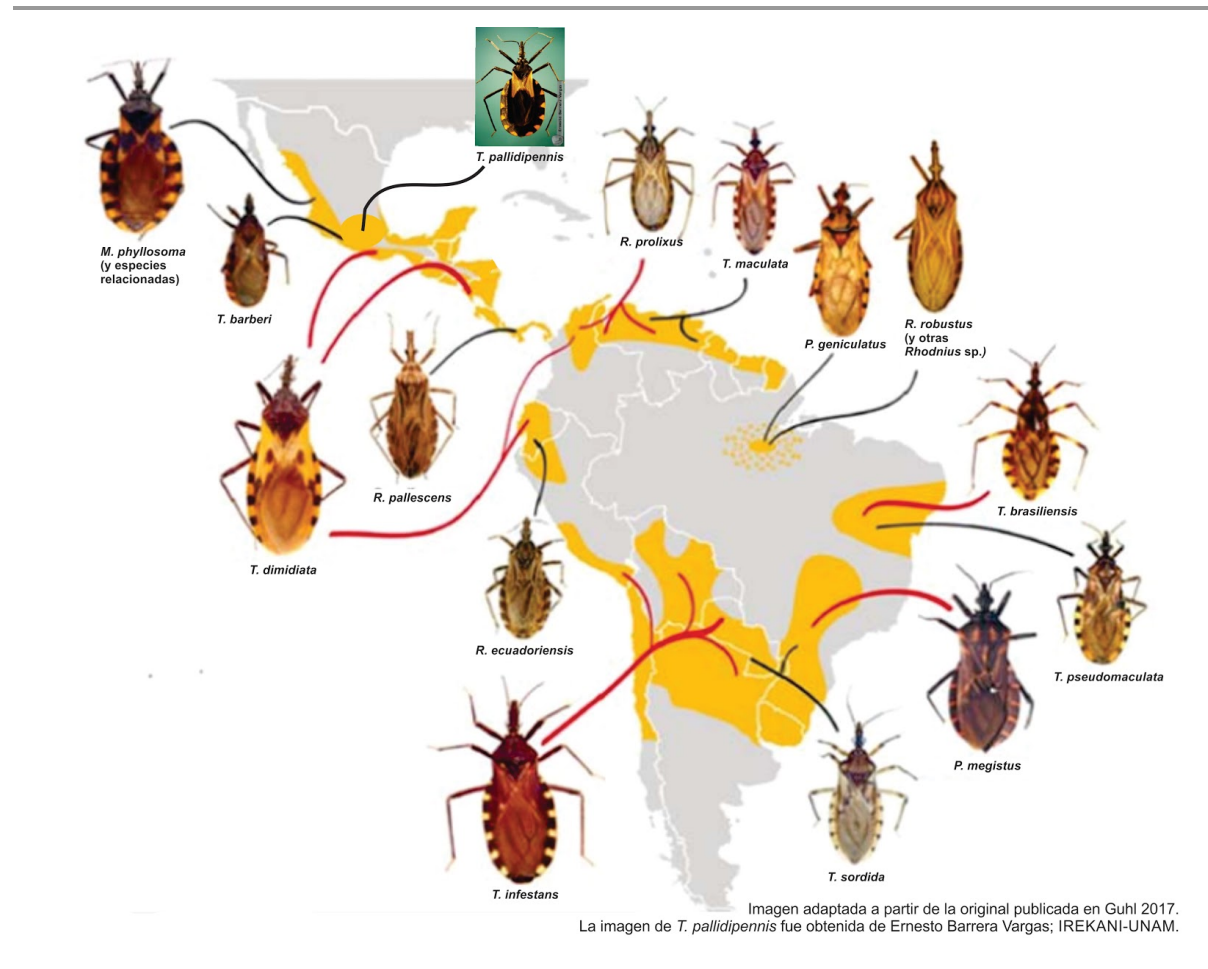


Figura 1. Mapa de distribución de algunos de los vectores de la enfermedad de Chagas en América Central y del Sur. La distribución de los vectores más importantes está señalada con líneas rojas.

1.5 Estrategias de control vectorial

Si bien la eliminación de la enfermedad de Chagas fue propuesta por la Organización Mundial de la Salud por primera vez en 1998 (OMS 1998), ya en el año 1991 los ministros de Salud de Argentina, Brasil, Bolivia, Chile, Uruguay y Paraguay lanzaron la “Iniciativa para la eliminación de la transmisión de la enfermedad de Chagas” (MERCOSUR 1991). En ese momento había 11 millones de personas infectadas en la región y 50 millones se encontraban en riesgo. La Organización Panamericana de la Salud tuvo un rol fundamental en la promoción y coordinación de las acciones propuestas por esta iniciativa.

Los objetivos comprendieron la interrupción de la transmisión vectorial y transfusional. La cooperación entre países se aseguró mediante los compromisos formales de introducir las actividades acordadas en sus programas nacionales de control.

Los datos actuales sobre desinfestación de casas, *screening* de bancos de sangre e incidencia de la enfermedad en menores de 5 años de edad indican que la transmisión fue interrumpida en Uruguay (1997), Chile (1999), Brasil (2006) y Paraguay (2018) (OMS 1994, 2000b, 2000a; OMS/TDR 2006; OPS 2018). En Argentina, se interrumpió la transmisión vectorial en 8 provincias endémicas (Misiones, Santa Fe, San Luis, Jujuy, Entre Ríos, La Pampa, Neuquén y Río Negro) y en 6 departamentos de Santiago del Estero (Spillmann *et al.* 2013). Otros cambios importantes obtenidos a partir de la Iniciativa en el Cono Sur fueron la implementación del *screening* sistemático en bancos de sangre en 20 de los 21 países endémicos y la disminución en un 40% del número de personas en riesgo de infección por el parásito (Moncayo & Silveira 2017). El modelo implementado en el Cono Sur fue adaptado a las iniciativas de los países andinos (1996; IPA), América Central (1997; IPCA) y el Amazonas (2004; AMCHA) (OMS 2002).

1.5.1 Control químico de insectos triatominos

En la década del '50, luego del éxito de la utilización del DDT para controlar mosquitos vectores de Malaria, comenzó a utilizarse este insecticida para controlar las poblaciones de triatominos pero fue descartado por su falta de efectividad. Posteriormente, se utilizó el hidrocarburo clorado HCH, aunque los tratamientos basados en este compuesto eran costosos y requerían de mucho tiempo. Estos factores, sumados al riesgo para la salud humana y el medio ambiente, llevaron hacia la década del '70 a su reemplazo progresivo por organofosforados y carbamatos, con la utilización de propoxur, fenitrotión y malatión. A partir de 1980, se comenzaron a utilizar los insecticidas piretroides los cuales presentan una rápida degradación en el ambiente y efectividad a bajas dosis, características ventajosas frente a otros neurotóxicos (Zerba 1999; Mougabure-Cueto & Picollo 2015).

Los programas tradicionales de control de vectores en América Latina se han focalizado en el rociado con insecticidas en domicilios y peridomicilios, siendo efectivos en la interrupción de ciclos de transmisión domésticos y peridomésticos (Moncayo & Silveira 2017). Estos programas siguen una serie de fases operativas comunes: fase preparatoria (mapeo del área a rociarse, programación y estimación de recursos); fase de ataque (dos rociados masivos con el insecticida en las casas infestadas en un lapso no mayor a seis meses); y fase de vigilancia (control de focos residuales) (Zerba 1999).

En coincidencia con el reporte de la presencia de insectos en domicilios luego de la aplicación de insecticidas piretroides, en el año 2005 se publicó el primer hallazgo de poblaciones de *T. infestans* altamente resistentes a estos compuestos en la provincia de Salta (Picollo *et al.* 2005). Coincidentemente, la Iniciativa del Cono Sur concluyó que las acciones tradicionales de control vectorial llevadas a cabo en el Gran Chaco debían ser revisadas por su falta de efectividad y determinó como prioritario establecer las causas de las fallas en los programas de control de triatomíneos en esa zona (OPS 2006b).

1.5.2 Fallas en las estrategias de control del vector

Entre los factores que podrían explicar la persistencia de la transmisión de Chagas en el Gran Chaco se encuentran los logísticos, económicos y políticos que llevan al rociado esporádico con insecticidas piretroides, dando lugar al surgimiento de altas tasas de reinfestación (Gürtler 2009; Gurtler *et al.* 2007; Vazquez-Prokopec *et al.* 2009). En sus inicios, la Iniciativa del Cono Sur evaluó que el control químico de los triatomíneos sería exitoso por mucho tiempo, debido que se consideraba baja la probabilidad de surgimiento de resistencia a insecticidas en estas especies. La suposición se basaba en el ciclo de vida largo, comparados por ejemplo con los mosquitos, y a que se creía que su variabilidad genética era baja (Guhl & Schofield 1996; Monteiro *et al.* 2001). Sin embargo, una serie de estudios llevados a cabo en el Chaco Argentino y Boliviano (Noireau *et al.* 2000, 2005; Ceballos *et al.* 2009) y en Chile (Bacigalupo *et al.* 2006) contradijeron esta primera idea. *T. infestans* demostró tener una alta variabilidad genética a lo largo de su rango de distribución, incluso en áreas sujetas a un rociado intensivo con insecticidas (García *et al.* 2003; Giordano *et al.* 2005; Bargues *et al.* 2006; Pérez de Rosas *et al.* 2007; Marcet *et al.* 2008; Piccinali *et al.* 2009). Hoy en día se considera que la resistencia a insecticidas por parte de poblaciones de *T. infestans* es uno de los factores principales en las fallas de control de triatomíneos en el Gran Chaco (Picollo *et al.* 2005; Gürtler 2009; Germano *et al.* 2012). Por lo tanto, la incorporación de programas de monitoreo y manejo de resistencia en los programas de control de triatomíneos se plantea como urgente.

2. Metabolismo de xenobióticos y fases de biotransformación

A lo largo de su historia evolutiva, los organismos han desarrollado mecanismos de defensa frente a la exposición a xenobióticos de origen natural. Estos mecanismos

constitutivos son también los utilizados por los insectos para hacer frente a la intoxicación por insecticidas neurotóxicos. Entre estos mecanismos se encuentran, por ejemplo, aquellos relacionados a la detoxificación de tóxicos de plantas (Després *et al.* 2007; Gatehouse 2002; Heidel-Fischer & Vogel 2015; Rane *et al.* 2016; War *et al.* 2012), lo cual podría explicar la rapidez con la que surgió la resistencia a una amplia gama de insecticidas que poseen origen botánico (Isman 2006).

La biotransformación de xenobióticos, entendida como la modificación de un compuesto para facilitar su excreción, puede dividirse en una serie de reacciones químicas denominadas de fase I y de fase II. El resultado de las reacciones de fase I es un compuesto más polar y con más posibilidades de ser excretado. Esta fase incluye reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis. Entre las superfamilias de enzimas más importantes a cargo de estas reacciones se encuentran los Citocromos P450 (CYPs) y las Carboxil/colesterasas (CCEs). En las reacciones de fase II, el metabolito de la fase I se conjuga a una molécula endógena que aumenta su solubilidad en agua. Estas reacciones son en su mayoría de glucuronidación, sulfatación, acetilación y conjugación con glutatión o aminoácidos. De estas reacciones, las llevadas a cabo por la superfamilia de Glutatión Transferasas (GSTs) son clave para la resistencia a xenobióticos (Kennedy & Tierney 2013).

Se han propuesto otras fases en la detoxificación de xenobióticos, como la asociada a la acción de los transportadores que actúan como primera respuesta frente al tóxico para evitar que ingrese a la célula (fase 0), o a los transportadores que actúan luego de las fases I y II, expulsando al compuesto resultante hacia el medio extracelular (fase III). Los transportadores ABC (*ATP-binding cassettes*) y las proteínas SLC (*solute carriers*) poseen un rol fundamental en estos procesos (Kennedy & Tierney 2013).

Uno de los efectos indirectos provocados por los insecticidas es la inducción del estrés oxidativo (revisado en Abdollahi *et al.* 2004) que se produce cuando existe una concentración desbalanceada de especies reactivas del oxígeno (ROS) respecto de los compuestos antioxidantes (Birben *et al.* 2012). Los organismos poseen mecanismos de defensa frente a este estrés, que incluyen la actividad de diversas enzimas entre las que se encuentran las GSTs (Birben *et al.* 2012). La relación entre el estrés oxidativo, la respuesta a insecticidas y el fenómeno de resistencia ha sido estudiada en varios grupos de insectos. Algunos ejemplos de estos estudios son los realizados en mosquitos (Müller *et al.* 2008; Otali *et al.* 2014; Oliver & Brooke 2016; Champion & Xu 2018), hemípteros (Vontas *et al.* 2001), lepidópteros (Yamamoto *et al.* 2011; Cao *et al.* 2018) e himenópteros (Shi *et al.* 2018). Los neuropéptidos, mensajeros químicos que poseen funciones regulatorias en

procesos fisiológicos vitales (Ons 2017) también cumplen un rol en la respuesta al estrés causado por el insecticida (revisado en Kodrík *et al.* 2015) que ha sido poco explorado.

2.1 Resistencia a insecticidas

La resistencia se ha definido como “el desarrollo de la habilidad en una cepa de insectos para tolerar dosis de tóxicos que han probado ser letales a la mayoría de los individuos en una población normal de la misma especie” (Comité de expertos en insecticidas de la OMS 1957). La resistencia constituye una adaptación a la presencia de un tóxico, debida a la presión de selección ejercida por el mismo en una población. Esto resulta en que los individuos resistentes contribuyan con más descendientes a las generaciones posteriores. Para que esta adaptación ocurra, los fenotipos resistentes deben existir en la población susceptible antes de la exposición, aunque en baja frecuencia (Kennedy & Tierney 2013).

El primer caso reportado de resistencia a insecticidas fue publicado en 1914 (Melander 1914) y documentó la falta de eficacia de un insecticida inorgánico, el polisulfuro de calcio. El uso de este tipo de insecticidas generó una lenta evolución de eventos de resistencia, probablemente por sus múltiples modos de acción. Más de 30 años después de ese reporte se documentaron sólo 11 casos adicionales de resistencia a estos compuestos (Mallet 1989). Los insecticidas orgánicos (como los organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides sintéticos) aparecieron más recientemente y son más selectivos, debido a que afectan principalmente a un único sitio blanco. Sin embargo, esta especificidad es también lo que pudo haber permitido la evolución rápida de la resistencia a estos compuestos. Desde 1945, se estima que alrededor de 500 a 1000 especies han desarrollado resistencia a un insecticida. Con la introducción de cada nueva clase, los casos de resistencia aparecieron entre los 2 y los 20 años posteriores (Mallet 1989; Kennedy & Tierney 2013).

La principal estrategia para manejar el surgimiento de la resistencia se basa en detectarla precozmente para evitar que el proceso de selección continúe. En este sentido, una estrategia completa de manejo de resistencia debería incluir el monitoreo toxicológico y genético de poblaciones sujetas a control químico, estudios de los mecanismos de resistencia, desarrollo de estrategias de control alternativas y estudio de los procesos biológicos involucrados en la evolución de la resistencia (Mougabure-Cueto 2004). Complementar estrategias variadas que lleven al mínimo la utilización de neurotóxicos

responde a la recomendación de la Organización Mundial de la Salud sobre el manejo integrado de vectores (OMS 2012).

2.1.1 Tipos de resistencia a insecticidas

Los mecanismos de resistencia a insecticidas pueden agruparse en cuatro categorías, que pueden darse de manera simultánea en una población: resistencia metabólica, insensibilidad en el sitio de acción, resistencia a la penetración y resistencia por comportamiento (Miller 1988). En general, los mecanismos de resistencia más comunes en insectos son los de resistencia metabólica y de insensibilidad en el sitio de acción. La resistencia fisiológica puede ser vista como el resultado de la interacción de ambos (Oppenoorth 1984).

2.1.1.1 Resistencia metabólica

La resistencia metabólica se basa principalmente en la acción de los sistemas enzimáticos que integran las fases de transformación I y II: CYPs, CCEs y GSTs. Los insectos resistentes metabolizan más rápidamente el insecticida gracias a la actividad de enzimas con mayor eficiencia catalítica o presentes en mayor concentración como consecuencia de un aumento de la transcripción y/o una amplificación génica en el genoma (revisado en Li *et al.* 2007).

2.1.1.2 Resistencia por insensibilidad en el sitio de acción

En este tipo de resistencia el sitio de acción del insecticida se modifica, lo cual resulta en una menor sensibilidad. Este mecanismo se ha reportado en numerosas especies y para diferentes proteínas blanco de los insecticidas más usados. En el caso de los piretroides y el DDT, la falta de sensibilidad a los insecticidas se denominó *knockdown resistance (kdr)* y fue descrita por primera vez en *Musca domestica* (Busvine 1951). El sitio de acción de estos insecticidas es el canal de sodio dependiente de voltaje (blanco de insecticidas piretroides y DDT) (Soderlund 2008). Otros sitios de acción son acetilcolinesterasa (organofosforados y carbamatos) (Lee *et al.* 2015), los receptores nicotínicos de acetilcolina (neonicotinoides y spinosad) (Bass *et al.* 2015) y los receptores GABA ionotrópicos (fipronil y dieldrín) (Buckingham *et al.* 2017).

2.1.1.3 Resistencia a la penetración

Este tipo de resistencia se ha detectado en varias especies de insectos y ocurre cuando la estructura cuticular posee alteraciones que resultan en una absorción disminuida

o más lenta de los químicos, lo que puede dar más tiempo para la detoxificación metabólica (Oppenoorth & Welling 1976; Scott 1990; Pedrini *et al.* 2009; Strycharz *et al.* 2013; Kasai *et al.* 2014; Calderón-Fernández *et al.* 2017; Dulbecco *et al.* 2018).

2.1.1.4 Resistencia por comportamiento

La resistencia por comportamiento ha sido poco documentada (Schmidt & Labrecque 1959). Ocurre cuando el insecto desarrolla la habilidad de evitar el contacto con el insecticida por un cambio en su comportamiento para alejarse del tóxico (Gatton *et al.* 2013).

2.1.2 Resistencia a insecticidas en triatominos

Las primeras evidencias de resistencia a insecticidas en triatominos fueron halladas en *R. prolixus* en Venezuela en la década de 1970 frente a insecticidas organoclorados, organofosforados y carbamatos (Gonzalez-Valdivieso *et al.* 1971; Cockburn 1972; Nocerino 1975). La resistencia moderada a piretroides en triatominos fue reportada por primera vez en el año 2000, en una población de *R. prolixus* de Venezuela y en una población de *T. infestans* en Brasil (Vassena *et al.* 2000).

A partir del año 2005 comenzaron a reportarse casos de resistencia muy alta (con tasas >100 respecto a una cepa susceptible) en poblaciones de *T. infestans* de Argentina, en coincidencia con fallas en las campañas de rociado en la provincia argentina de Salta y en el sur de Bolivia (Picollo *et al.* 2005; Santo Orihuela *et al.* 2008). Previamente se habían hallado niveles de resistencia bajos que no representaban un problema para el control vectorial (Gonzalez-Audino *et al.* 2004). Tanto las poblaciones de Argentina como las de Bolivia presentaron susceptibilidad a otros tipos de insecticidas (Santo Orihuela *et al.* 2008). Algunos años más tarde se detectó otro foco de resistencia muy alta en la provincia de Chaco, que parece haberse originado de manera independiente del foco salteño-boliviano (Mougabure-Cueto & Picollo 2015; Sierra *et al.* 2016).

2.1.2.1 Mecanismos de resistencia a piretroides en triatominos

En triatominos se han identificado distintos mecanismos involucrados en el fenómeno de resistencia a insecticidas piretroides. El más relevante parece ser la insensibilidad en el sitio de acción, reportada por primera vez por nuestro grupo de trabajo en el año 2012. Detectamos la mutación L1014F del tipo *kdr* en *T. infestans* resistentes de la localidad salteña de Madrejones (Fabro *et al.* 2012). Esta sustitución es la mutación *kdr* más habitual relacionada con resistencia a piretroides en insectos (Dong *et al.* 2014).

Posteriormente, en el año 2014 reportamos la mutación *kdr* L925I en una población de alta resistencia de la localidad de El Malá, provincia de Chaco (Capriotti *et al.* 2014). Además de la identificación de las mutaciones, en nuestro grupo de trabajo se desarrollaron ensayos moleculares para detectarlas (Capriotti *et al.* 2014; Fabro *et al.* 2012) y estos fueron utilizados para caracterizar distintas poblaciones de *T. infestans* de Argentina y Bolivia con tasas de resistencia variables. Los resultados sugirieron que existen dos focos de resistencia diferenciados, uno asociado a la mutación L1014F en la frontera Argentino-Boliviana y el otro asociado a la mutación L925I en la zona del Chaco argentino (Sierra *et al.* 2016). Estos resultados concuerdan con el hallazgo de poblaciones resistentes a lo largo de esa distribución geográfica (Picollo *et al.* 2005; Santo Orihuela *et al.* 2008; Toloza *et al.* 2008; Germano *et al.* 2010, 2012, 2013, 2014; Lardeux *et al.* 2010; Depickère *et al.* 2012; Roca-Acevedo *et al.* 2013; Gomez *et al.* 2014).

Diversos estudios apuntan hacia la resistencia metabólica como un mecanismo contributivo a la alta resistencia a piretroides en *T. infestans*. Se ha reportado un rol de CYPs y CCEs a través de determinaciones de la actividad enzimática (Gonzalez-Audino *et al.* 2004; Picollo *et al.* 2005; Santo Orihuela *et al.* 2008; Germano *et al.* 2012). A nivel génico, se ha detectado la expresión aumentada de CYPs de la familia 4 en poblaciones resistentes de Chaco y Salta (Grosso *et al.* 2016; Traverso *et al.* 2017; Dulbecco *et al.* 2018) y una inducción de la expresión de ciertos CYPs de las familias 4, 3085 y 3092 luego de la topicación con deltametrina tanto en poblaciones resistentes como susceptibles a piretroides (Grosso *et al.* 2016; Dulbecco *et al.* 2018). Además, recientemente nuestro grupo ha demostrado que la disminución de la expresión de la GST de la clase Delta aumenta la susceptibilidad a deltametrina en *R. prolixus* (Sierra 2018), lo cual sugiere que esta superfamilia también podría estar implicada en la detoxificación de piretroides en triatominos.

En términos de resistencia a la penetración, en una población resistente de *T. infestans* se detectó una mayor cantidad de hidrocarburos cuticulares y una cutícula más gruesa en comparación con los insectos susceptibles, factores que podrían ocasionar una menor penetración del insecticida (Pedrini *et al.* 2009). Se ha observado la sobreexpresión de CYPs de los clados 3 y 4 en la cutícula de insectos resistentes con respecto a los susceptibles (Calderón-Fernández *et al.* 2017). Asimismo, un estudio reciente demuestra que la detoxificación mediada por CYPs está activa en la cutícula de *T. infestans* (Dulbecco *et al.* 2018). En este estudio se hallaron varios genes CYP del clado 4 sobreexpresados en la cutícula de poblaciones resistentes y se observó que la topicación con deltametrina induce la transcripción de algunos CYPs en ese tejido (Dulbecco *et al.* 2018).

Por último, es interesante destacar que se ha observado un aumento de la expresión del neuropéptido AKH luego del tratamiento con deltametrina en *T. infestans* (Sierra 2018). Esta hormona se encuentra implicada en la respuesta al estrés oxidativo que puede ser causado por los insecticidas (revisado en Kodrík *et al.* 2015). La modulación de la expresión de AKH por el tratamiento con deltametrina podría tener relación con la detoxificación, por lo que sería interesante estudiar su rol en la respuesta a insecticidas y los fenómenos de resistencia en triatominos. Por otra parte, se halló una sobreexpresión del neuropéptido ITG-like en una población resistente a deltametrina de *T. infestans* (Traverso *et al.* 2016), lo que podría sugerir un papel de ITG-like en la detoxificación. Serán necesarios estudios funcionales para determinar si la diferencia en la expresión observada se debe a una característica poblacional o si posee una relación con el fenómeno de resistencia a piretroides.

3. Impacto de las tecnologías de secuenciación de nueva generación en el área de entomología molecular

3.1 *La secuenciación de genomas y transcriptomas*

Las tecnologías de secuenciación de nueva generación representaron un avance tecnológico sobre los métodos de secuenciación de ADN tradicionales, ya que permiten obtener información de miles a millones de secuencias en paralelo, a partir de la preparación de genotecas y sin necesidad de utilizar un sistema celular. Estas tecnologías dieron lugar a la secuenciación de genomas a una velocidad sin precedentes y permitieron a los científicos acelerar estudios sobre los sistemas biológicos (van Dijk *et al.* 2014).

Desde la secuenciación del genoma de *Drosophila melanogaster* en el año 2000, donde se propuso que su anotación iba a constituirse como una herramienta crucial para una nueva era de estudios funcionales (Adams *et al.* 2000), se secuenciaron los genomas de más de 300 especies de artrópodos (<http://i5k.github.io/>). La información de la secuencia génica es la base para el diseño de una gran cantidad de experimentos que permiten estudiar la función de genes.

En contraste con la era pre-genómica, cuando los investigadores típicamente clonaban y secuenciaban genes que poseían un rol documentado, con el aumento del número de genomas secuenciados empezaron a descubrirse proteínas cuyas funciones no eran conocidas. Esto representa el desafío de clasificarlas según su homología con otras

proteínas, y predecir su posible función, estructura y origen evolutivo (Koonin *et al.* 1998). Con el aumento de la disponibilidad de secuencias, ha quedado claro que las porciones codificantes del genoma están organizadas jerárquicamente en familias y superfamilias. Los análisis biológicos comparativos permiten, entre otras cosas, predecir la estructura y función de proteínas no caracterizadas, inferir los mecanismos por los cuales aparecieron nuevos genes y funciones y entender las relaciones entre los cambios del genoma y las innovaciones morfológicas (Thornton & Desalle 2000).

En ausencia de información genómica, la secuenciación de transcriptomas (conocida como *RNA-seq*) constituye una buena alternativa para la interpretación de los elementos funcionales de un genoma y es útil para realizar aproximaciones tanto cualitativas como cuantitativas. Si bien existen otros métodos para estudiar la expresión génica, las tecnologías de secuenciación de nueva generación poseen una serie de ventajas: no es necesario contar con información genómica de la especie a estudiar, permiten detectar variaciones a nivel de un solo nucleótido y tienen la capacidad de detectar niveles de expresión diferencial muy amplios, ya que no poseen un límite de detección superior. Además, se considera una técnica de una gran precisión y con alta reproducibilidad (Wang *et al.* 2009).

3.2 Secuenciación de nueva generación y su impacto en el campo de la entomología médica

El advenimiento de las nuevas tecnologías de secuenciación permitió grandes avances en el campo de la entomología médica con la posibilidad de obtener e intercambiar información sobre insectos transmisores de enfermedades, incluso aquellos que no son organismos modelo, a un costo relativamente bajo. En este sentido, la información generada tiene la capacidad de facilitar y complementar estudios realizados en diferentes grupos de investigación, ya que al estar disponible de manera pública puede ser reutilizada con distintos enfoques (Rinker *et al.* 2016).

Algunos ejemplos de vectores de enfermedades que poseen información de secuencia genómica y/o transcriptómica disponible son los mosquitos (transmisores de Malaria, Dengue y Fiebre Amarilla, entre otras), flebotominos (transmisores de Leishmaniasis), moscas *tse-tse* (transmisoras de la enfermedad del sueño) e insectos triatominos, que constituyen el objeto de estudio de nuestro trabajo (revisado en Rinker *et al.* 2016).

3.2.1 Estudios genómicos y transcriptómicos en triatominos

El triatomino *R. prolixus* es el único vector de la enfermedad de Chagas que posee su secuencia genómica disponible que puede ser consultada en el sitio www.vectorbase.org (Mesquita *et al.* 2015). La predicción génica para este genoma contiene 15.456 genes codificantes para proteínas, distribuidas en 27.782 *scaffolds* con una cobertura de 8x (Mesquita *et al.* 2015). A partir de la secuenciación del genoma se publicaron una gran cantidad de trabajos que permitieron una mejor comprensión de la fisiología del insecto. Además de su genoma, se ha publicado información de secuenciación de transcriptomas de diferentes tejidos (Ribeiro *et al.* 2014; Ons *et al.* 2016; Latorre-Estivalis *et al.* 2017).

Si bien al día de hoy no se cuenta con otros genomas de triatominos disponibles, se han realizado numerosas aproximaciones transcriptómicas al estudio de estos vectores. Recientemente, se han publicado los transcriptomas normalizados de los triatominos *T. infestans*, *T. dimidiata* y *T. pallidipennis* que permitieron plantear nuevas hipótesis sobre las adaptaciones de estos insectos a condiciones fisiológicas extremas y a diversos nichos ecológicos (Martínez-Barnette *et al.* 2018), estudiar el repertorio de neuropéptidos y receptores (Ons *et al.* 2016; Traverso *et al.* 2016) y realizar comparaciones interespecíficas en cuanto a la composición de superfamilias de enzimas detoxificativas (Traverso *et al.* 2017). Por otra parte, un trabajo reciente se centró en el análisis del transcriptoma del integumento de *T. infestans*, confirmando el rol de esta estructura en el fenómeno de resistencia a insecticidas (Calderón-Fernández *et al.* 2017). Otros transcriptomas publicados fueron los de *Triatoma brasiliensis* (Marchant *et al.* 2015, 2016), de cabeza (Gonçalves *et al.* 2017) y de glándulas salivales de las especies *T. infestans* (Schwarz *et al.* 2014) y de ese mismo tejido en *Triatoma rubida* (Ribeiro *et al.* 2012), *Triatoma matogrossensis* (Assumpção *et al.* 2012) y *T. dimidiata* (Kato *et al.* 2010). Por último, la secuenciación de los transcriptomas de *Rhodnius montenegrensis* y *Rhodnius robustus* se utilizó para estudiar las diferencias genéticas entre estas dos especies (de Carvalho *et al.* 2017).

3.3 Herramientas transcriptómicas y moleculares para el estudio de la detoxificación en insectos

Las tecnologías de secuenciación han sido ampliamente utilizadas para estudiar los sistemas detoxificativos y el fenómeno de resistencia a insecticidas en diferentes órdenes de insectos. Algunos ejemplos de estos trabajos se detallan en la Tabla 1.

Orden	Especie	Aspecto abordado mediante análisis de datos de secuenciación	Referencia
Diptera	<i>Anopheles gambiae</i>	Expresión diferencial de genes en poblaciones resistentes y susceptibles a piretroides	Bonizzoni <i>et al.</i> 2012
		Expresión diferencial de genes en poblaciones resistentes y susceptibles a piretroides	Bonizzoni <i>et al.</i> 2015
	<i>Aedes aegypti</i>	Respuesta a la exposición a los insecticidas permetrina (piretroide), imidacloprida (neonicotinoide) y propoxur (carbamato)	David <i>et al.</i> 2010
		Expresión diferencial de poblaciones seleccionadas con los insecticidas permetrina (piretroide), imidacloprida (neonicotinoide) y propoxur (carbamato)	David <i>et al.</i> 2014
	<i>Culex pipens pallens</i>	Expresión diferencial de genes en poblaciones resistentes y susceptibles a piretroides	Lv <i>et al.</i> 2016
	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Expresión diferencial de genes en una población seleccionada luego de varias generaciones de exposición a permetrina con respecto a la población susceptible	Reid <i>et al.</i> 2012
		Respuesta de una población resistente a la exposición al piretroide permetrina	Reid <i>et al.</i> 2018
	<i>Bactrocera dorsalis</i>	Identificación de genes potencialmente involucrados en la respuesta a insecticidas	Hsu <i>et al.</i> 2012
Hymenoptera	<i>Apis mellifera</i>	Respuesta a la intoxicación con fipronil (neonicotinoide) en el intestino medio	Aufauvre <i>et al.</i> 2014
		Respuesta a la exposición al neonicotinoide imidacloprida	Wu <i>et al.</i> 2017
Lepidoptera	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Expresión diferencial de poblaciones resistentes y susceptibles a lufenuron (inhibidor de la síntesis de quitina) y su respuesta a la exposición con este insecticida	Bezerra do Nascimento <i>et al.</i> 2015
	<i>Lymantria dispar</i>	Identificación de genes potencialmente involucrados en la respuesta a insecticidas	Cao <i>et al.</i> 2015
	<i>Plutella xylostella</i>	Expresión diferencial de genes en poblaciones resistentes y susceptibles a mevinfos (organofosforado)	Hsu <i>et al.</i> 2016
Hemiptera	<i>Cimex lectularius</i>	Identificación de genes potencialmente involucrados en la respuesta a insecticidas	Bai <i>et al.</i> 2011
		Expresión diferencial de genes en poblaciones resistentes y susceptibles a piretroides	Adelman <i>et al.</i> 2011
		Expresión diferencial de genes en poblaciones resistentes y susceptibles a deltametrina (piretroide)	Mamidala <i>et al.</i> 2012
	<i>Sogatella</i>	Respuesta a la exposición al neonicotinoide	Yang <i>et al.</i> 2016

	<i>furcifera</i>	cicloxaprida	
		Respuesta a la exposición a los insecticidas imidacloprida (neonicotinoide), deltametrina (piretroide) y triazofos (organofosforado)	Zhou <i>et al.</i> 2018
	<i>Triatoma dimidiata</i>	Identificación de genes potencialmente involucrados en la respuesta a insecticidas	Traverso <i>et al.</i> 2017
	<i>Triatoma pallidipennis</i>		
	<i>Triatoma infestans</i>	Identificación de genes potencialmente involucrados en la respuesta a insecticidas	Traverso <i>et al.</i> 2017
		Identificación de genes potencialmente involucrados en la respuesta a insecticidas en integumento	Calderón-Fernández <i>et al.</i> 2017
	<i>Rhodnius prolixus</i>	Identificación de genes potencialmente involucrados en la respuesta a insecticidas	Schama <i>et al.</i> 2016
		Identificación de genes potencialmente involucrados en la respuesta a insecticidas	Traverso <i>et al.</i> 2017
Tabla 1. Ejemplos de investigaciones que utilizaron herramientas genómicas y/o transcriptómicas para el estudiar de la respuesta, detoxificación y/o resistencia a insecticidas en insectos de diferentes órdenes.			

Con respecto a las técnicas moleculares disponibles, la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) es utilizada como método alternativo para evaluar la expresión de genes de interés. Se ha utilizado como método de validación de los resultados bioinformáticos en varios de los trabajos detallados en la Tabla 1, o en abordajes adicionales frente a diferentes condiciones fisiológicas, incluyendo triatominos (Traverso *et al.* 2016, 2017; Dulbecco *et al.* 2018).

En cuanto a las herramientas moleculares de validación funcional, la información de secuencia obtenida por las aproximaciones bioinformáticas permiten planificar experimentos para indagar sobre la existencia de una causalidad entre expresión diferencial de genes y los fenómenos biológicos observados. El silenciamiento génico mediado por ARN de interferencia (ARNi) se ha convertido en una técnica muy utilizada para abordar este tipo de estudios, ya que permite disminuir la expresión de genes de manera específica utilizando ARN de doble cadena (ARNdc) complementario al gen cuya expresión se desea silenciar (Fire *et al.* 1998). El ARNi se ha utilizado para estudiar el rol de ciertos genes en procesos detoxificativos de insectos, incluyendo triatominos. En nuestro grupo de trabajo, recientemente se ha demostrado que la disminución de la expresión de la GST de la clase Delta mediante esta técnica aumenta la susceptibilidad a deltametrina en *R. prolixus* (Sierra 2018). En otro estudio reciente, se aplicó esta técnica para estudiar el rol de genes CYP en

la detoxificación de deltametrina en una población de *T. infestans* resistente a este insecticida (Dulbecco *et al.* 2018).

Dadas las ventajas de la utilización en conjunto de las técnicas mencionadas, en este trabajo se propone utilizar herramientas genómicas, transcriptómicas y moleculares para estudiar la respuesta detoxificativa en los insectos triatominos. En primer lugar, se realizó un análisis comparativo de grupos de genes de interés en cuatro especies de esta subfamilia de insectos y se aprovechó la información en bases de datos de expresión génica disponibles en *R. prolixus*, con el fin de evaluar la transcripción de algunos de esos genes (Capítulos 1 y 2). Por otra parte, se abordó el análisis de la respuesta transcriptómica global del insecto *T. infestans* al insecticida piretroide deltametrina mediante una aproximación de *RNA-seq* y análisis de expresión diferencial (Capítulo 3). Por último, en base a hipótesis planteadas por los resultados previos, se utilizó la técnica de silenciamiento génico mediado por ARNi junto con ensayos fisiológicos para contrastar el rol del neuropéptido ITG-like en la respuesta a insecticidas en *R. prolixus* (Capítulo 4).

Hipótesis general

Existen múltiples causas genéticas subyacentes al fenómeno de resistencia a insecticidas en triatominos.

Objetivos generales

- Profundizar en el conocimiento de los mecanismos de detoxificación y las posibles causas de la resistencia a insecticidas piretroides en insectos triatominos.
- Aportar conocimiento para un mejor manejo del control vectorial de la enfermedad de Chagas.

Materiales y métodos

1. Búsqueda de secuencias en bases de datos transcriptómicas, cuantificación de la expresión y análisis de secuencias resultantes

1.1 Bases de datos utilizadas

1.1.1 Transcriptomas normalizados de *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata* y *Triatoma pallidipennis*.

Las bases de datos utilizadas para la búsqueda de secuencias de interés fueron generadas por Martínez-Barnetche *et al.* 2018. El material de partida de estas muestras incluyó la extracción de ARN de un homogenado de todos los estadios del desarrollo de las especies mencionadas (desde huevo hasta adulto macho y hembra). Se realizó una normalización con el *kit* Mint-2 (Evrogen) para eliminar la sobre-representación de transcritos muy abundantes y poder identificar genes poco expresados. La secuenciación se realizó con el sistema GS FLX+ 454-Roche. Las bases de datos se encuentran disponibles en VectorBase (<https://www.vectorbase.org/downloads>). Las lecturas fueron ensambladas con el programa Newbler assembler (para más detalles sobre la preparación de estas bases de datos consultar Martínez-Barnetche *et al.* 2018).

1.1.2 Transcriptoma de glándulas salivales de *T. infestans*

La base de datos transcriptómica correspondiente a este tejido fue obtenida de VectorBase (<https://www.vectorbase.org/downloads>) para realizar la búsqueda de neuropéptidos. Los datos fueron generados por Schwarz *et al.* 2014; el material de partida corresponde a glándulas salivales de diferentes cepas de insectos y de diferentes estadios de desarrollo y alimentación (para más detalles sobre la preparación de estas bases de datos consultar Schwarz *et al.* 2014).

1.1.3 Transcriptomas de antenas de *R. prolixus*

Las bases de datos transcriptómicas correspondientes a este tejido fueron obtenidas de Latorre-Estivalis *et al.* 2017. El ARN total fue extraído de antenas de ninfas de V estadio de *R. prolixus* (adultos hembra y macho en ayuno por 21 días) y a continuación se generaron 3 bibliotecas de ADNc que fueron secuenciadas con la tecnología Illumina

HiSeq2000. Las lecturas fueron utilizadas para mapear contra el genoma de *R. prolixus* (para más detalles sobre la preparación de estas bases de datos consultar Latorre-Estivalis *et al.* 2017).

1.1.4 Transcriptomas de sistema nervioso de *R. prolixus*

Las bases de datos transcriptómicas correspondientes a sistema nervioso central fueron obtenida de Ons *et al.* 2016. Las muestras de este tejido utilizadas para la generación de los transcriptomas analizados corresponden a grupos de adultos (macho y hembra) a diferentes tiempos post-alimentación (1, 4 y 24 horas post-ingesta). La secuenciación se realizó con un equipo Illumina HiSeq 2000 (para más detalles sobre la preparación de estas bases de datos consultar Ons *et al.* 2016).

1.1.5 Transcriptomas de diferentes tejidos de *R. prolixus*

Para el análisis de expresión en los transcriptomas de intestino medio anterior y posterior, recto, túbulos de Malpighi, cuerpo graso, gónadas y cuerpo entero de *R. prolixus* se utilizaron las bases de datos publicadas en <http://rhodnius.iq.ufrj.br/>. Estas genotecas fueron secuenciadas utilizando la tecnología de pirosecuenciamiento. La información utilizada se encuentra en la tabla New-S1-Full.xlsx.

1.2 Cuantificación de la expresión génica en transcriptomas

1.2.1 Mapeo de lecturas

En el caso de la genoteca de sistema nervioso central, las lecturas filtradas por calidad y sin adaptadores (Ons *et al.* 2016) fueron mapeadas contra el genoma de *R. prolixus* (versión RproC3.13) a través del programa TopHat v2.0.11 (Trapnell *et al.* 2012). La información del mapeo y la información genómica se utilizaron para obtener los niveles de expresión correspondientes a cada gen, medidos según el parámetro FPKM (fragmentos por kilobase del transcripto por millón de lecturas mapeadas) con el programa Cufflinks v2.1.0 (Trapnell *et al.* 2012). El programa Cuffmerge (Trapnell *et al.* 2012) fue utilizado para unir la predicción del transcriptoma al archivo de anotación del genoma (denominado archivo GTF), y el programa Cuffdiff (Trapnell *et al.* 2012) se utilizó para comparar los valores de FPKM para cada transcripto en cada condición. En el caso de las genotecas de antenas, los valores de FPKM se obtuvieron de Latorre-Estivalis *et al.* 2017.

Para visualizar de forma comparativa las diferencias en la expresión génica entre las diferentes genotecas de sistema nervioso central y antena, se utilizaron mapas de calor con la información de expresión expresada como Log10 FPKM + 1, realizados con el paquete de R gplot.

1.3 Identificación de los miembros de las superfamilias proteicas involucradas en la respuesta a insecticidas en el genoma de *R. prolixus* y en transcriptomas normalizados de *Triatoma spp.*

Se utilizaron los dominios PFAM correspondientes a cada una de las superfamilias de interés: PF00067 (CYPs), PF00135 (CCEs) y PF02798 y PF00043 (GSTs) como *queries* en búsquedas a través del programa BLAST (Altschul *et al.* 1990), en los transcriptomas normalizados de *T. infestans*, *T. dimidiata* y *T. pallidipennis* (descritos en el punto 1.1 del presente apartado) y en el genoma de *R. prolixus* (versión RproC3.13, disponible en www.vectorbase.org). Las secuencias obtenidas a partir de los transcriptomas fueron analizadas con el programa InterProScan (Jones *et al.* 2014) para obtener los marcos abiertos de lectura y codificantes para proteínas a partir de las coincidencias con las bases de datos Gene3d, PfamA y SuperFamily. Para descartar falsos positivos, las secuencias resultantes fueron comparadas mediante *tblastn* en el NCBI (National Center for Biotechnological Information; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y por último curadas manualmente. Para la búsqueda de enzimas GST microsomales se utilizaron como *queries* las secuencias ortólogas ya caracterizadas en las especies *R. prolixus*, *D. melanogaster*, *A. gambiae*, *A. pisum* y *A. mellifera*, dado que no presentan los dominios característicos del resto de las GSTs y por ello no pueden ser identificadas por un dominio PFAM. Las secuencias de proteínas de cada superfamilia obtenidas a partir de este análisis y su nomenclatura se encuentran disponibles en el material suplementario de Traverso *et al.* 2017 (archivo suplementario S2 y hoja 5 del archivo suplementario S1, respectivamente).

1.4 Análisis filogenéticos

Las filogenias de cada superfamilia se basaron en alineamientos realizados por Clustal Ω (Sievers & Higgins 2014), utilizando los HMM (Hidden Markov Models) correspondientes a cada dominio PFAM. Los árboles filogenéticos se realizaron mediante inferencia bayesiana con el programa BEAST versión 1.8.3 (Drummond & Rambaut 2007) en la plataforma Cipres Science Gateway (Miller *et al.* 2010). El programa Beauti de este paquete (Drummond & Rambaut 2007) fue utilizado para generar los archivos de entrada

correspondientes. Las filogenias se evaluaron por duplicado. El programa Tracer versión 1.6.0 (<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>) se utilizó para visualizar si los resultados obtenidos eran robustos (valores de *effective sample size* mayores a 200). El número de generaciones utilizado varió entre 5 a 30 millones según la cantidad de secuencias de cada filogenia. Cada par de resultados fue combinado con el programa LogCombiner versión 1.8.3 (Drummond & Rambaut 2007), descartando el 10% inicial de cada uno. El árbol de máxima credibilidad fue generado con el programa TreeAnnotator versión 1.8.3 (Drummond & Rambaut 2007). Los resultados fueron visualizados en línea con la herramienta iTol (Letunic & Bork 2016).

2. Identificación de neuropéptidos y análisis estructural

La identificación de los genes que codifican para los precursores de neuropéptidos se realizó a partir de una base de datos de los neuropéptidos conocidos en *R. prolixus* (Ons 2017) y su comparación a través de búsquedas *tblastn* (Altschul *et al.* 1990) en los transcriptomas normalizados de *T. infestans*, *T. dimidiata* y *T. pallidipennis* y en el transcriptoma de glándulas salivales de *T. infestans*. Se incluyeron ortólogos de *Bombyx mori*, *D. melanogaster* y *Tribolium castaneum* para completar aquellos neuropéptidos que no han sido hallados o se conocen en forma incompleta en *R. prolixus*.

El análisis estructural de los precursores de neuropéptidos encontrados se realizó con el programa SignalP3 para la identificación del péptido señal (Bendtsen *et al.* 2004). Para la predicción de los sitios de clivaje por endopeptidasas se utilizaron las reglas propuestas por Veenstra 2000. Los alineamientos múltiples de secuencias se realizaron con el programa Clustal Ω (Sievers & Higgins 2014) y posteriormente fueron corregidos manualmente.

3. El transcriptoma de *T. infestans*

3.1 Preparación de muestras y secuenciación

Se utilizaron ninfas de *T. infestans* de I estadio de una población proveniente de Colonia Castelli (Departamento de Gral. Güemes, Provincia de Chaco, Argentina), mantenidas en el insectario del Centro de Referencia de Vectores (CeReVe), Secretaría de Salud de la Nación, Valle de Punilla. Los insectos fueron provistos por el Dr. Gastón Mougabure Cueto, gracias a una colaboración establecida entre ambos grupos. La

población fue caracterizada toxicológicamente en el CeReVe, y reveló un nivel de resistencia a deltametrina que fue considerado como bajo (tasa de resistencia = 3,06). Los insectos se agruparon en grupos de entre 9 y 15 individuos, y fueron topicados con 0,2 μ l de deltametrina disuelta en acetona en una dosis que resulta letal para el 30% de los individuos de esa población (DL_{30}). Los controles fueron topicados con el mismo volumen de acetona. Cuatro horas después de la aplicación tópica, se recolectaron 4 muestras de cada tratamiento (cada una con un total de 9 a 15 insectos enteros) y fueron colocados en el reactivo TRIzol y almacenados a -80 °C hasta la extracción de ARN, que se realizó según el protocolo detallado en el Anexo II. La calidad del ARN fue evaluada en un gel de agarosa 1%. Se eligieron 4 muestras de cada grupo para ser enviadas al servicio de secuenciamiento de la empresa Novogene. Las bibliotecas fueron preparadas en Novogene con el *kit* NEB Next® Ultra™ RNA Library Prep Kit (New England Biolabs, Inc.) y secuenciadas en un equipo Illumina HiSeq 2000, obteniéndose lecturas de 150 pares de bases de tipo *paired-end*.

3.2 Ensamblado del transcriptoma y evaluación de calidad

3.2.1 Evaluación de calidad de lecturas y limpieza de adaptadores

La calidad de las lecturas obtenidas fue analizada con el programa FASTQC versión 0.10.1 (Andrews 2010). La limpieza de adaptadores y por calidad se realizó con el programa Trimmomatic versión 0.36 (Bolger *et al.* 2014), según el comando:

```
$ java -jar trimmomatic-0.36.jar PE -phred33 \  
Muestra_1.fq.gz Muestra_2.fq.gz Muestra.paired.1.fastq.gz \  
Muestra.single.1.fastq.gz Muestra.paired.2.fastq.gz \  
Muestra.single.2.fastq.gz \  
TRAILING:5 LEADING:5 SLIDINGWINDOW:4:15 \  
ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE-2.fa:2:30:10 MINLEN:50 2> Muestra.trim.log
```

3.2.2 Ensamblado *de novo*

El ensamblado *de novo* de las lecturas fue realizado con el programa Trinity versión 2.6.6 (Haas *et al.* 2013) según el comando:

```
$ Trinity --seqType fq --max_memory 25G --left \  

```

```
muestras.paired.1.fastq.gz --right muestras.paired.2.fastq.gz \
--CPU 10 --full_cleanup --output trinity > trinity.log 2>&1 &
```

3.3.3 Evaluación de calidad del transcriptoma obtenido

Se utilizó el script del programa Trinity denominado "*TrinityStats.pl*" para evaluar las estadísticas descriptivas del ensamble obtenido. El programa BUSCO versión 3.0.2 (Simão *et al.* 2015; Waterhouse *et al.* 2017) se utilizó para evaluar la representación de la base de datos de insectos en el ensamblado generado según el comando:

```
$ python3 scripts/run_BUSCO.py -i trinity.fasta \
-o trinity_30-10-18_3_vs_buscoINSECTA -l insecta_odb9/ \
-m transcriptome -c 1
```

3.3.4 Obtención de marcos de lectura

Los marcos de lectura abiertos fueron obtenidos con el programa Transdecoder versión 5.3.0 (<https://transdecoder.github.io/>). En primer lugar, se utilizó el script "*TransDecoder.LongOrfs*" para obtener posibles marcos de lectura codificantes para al menos 50 aminoácidos de longitud, mediante el siguiente comando:

```
$ TransDecoder.LongOrfs -t trinity.fasta -m 50
```

Con el resultado obtenido (*longest_orfs.pep*) se realizaron búsquedas de *blastp* para obtener homologías con la base de datos Uniprot (*reviewed-SwissProt*, The UniProt Consortium, 2018), y búsquedas de dominios de la base de datos Pfam-A (Finn *et al.* 2016) mediante HMMER (hmmerr.org), utilizando los siguientes comandos:

```
$ blastp -query longest_orfs.pep -db uniprot_sprot \
-max_target_seqs 1 -outfmt 6 -evalue 1e-5 -num_threads 10 \
> blastp.outfmt6
```

```
$ hmmscan --cpu 8 --domtblout pfam.domtblout \
Pfam-A.hmm longest_orfs.pep
```


Para obtener las predicciones de marcos de lectura finales, se ejecutó “*TransDecoder.Predict*” según:

```
$ TransDecoder.Predict -t trinity.fasta \  
--retain_pfam_hits pfam.domtblout \  
--retain_blastp_hits blastp.outfmt6
```

3.3.5 Anotación del transcriptoma

Para anotar las secuencias obtenidas se utilizó el programa Trinotate (<https://trinotate.github.io/>) a partir de las anotaciones provenientes de las búsquedas mediante BLAST de las bases de datos Uniprot (*reviewed-SwissProt*), Pfam-A utilizando el programa HMMER (*hmm.org*), *dmel-all-translation-r6.24*, obtenida de FlyBase (Thurmond *et al.* 2019) y *CDC_PEPTIDES_RproC3.3*, obtenidas de VectorBase (Giraldo-Calderón *et al.* 2015). Estas búsquedas se realizaron utilizando como *query* todos los transcriptos del transcriptoma generado en el caso de *blastx*, y los péptidos predichos por Transdecoder en el caso de *blastp*, según los siguientes comandos:

```
$ blastx -query trinity.fasta -db uniprot_sprot.pep -num_threads 8 \  
-max_target_seqs 1 -outfmt 6 -evaluate 1e-3 > blastx.outfmt6
```

```
$ blastp -query trinity.fasta.transdecoder.pep \  
-db uniprot_sprot.pep -num_threads 8 -max_target_seqs 1 \  
-outfmt 6 -evaluate 1e-3 > blastp.outfmt6
```

```
$ hmmscan --cpu 12 --domtblout TrinotatePFAM.out Pfam-A.hmm \  
trinity.fasta.transdecoder.pep > pfam.log
```

```
$ blastx -query trinity.fasta -db dmel-all-translation-r6.24.fasta \  
-num_threads 8 -max_target_seqs 1 -outfmt 6 -evaluate 1e-3 \  
> blastx_vs_dmel.outfmt6
```

```
$ blastp -query trinity_30-10-18_3.Trinity.fasta.transdecoder.pep \  
-db dmel-all-translation-r6.24.fasta -num_threads 8 \  
-max_target_seqs 1 -outfmt 6 -evaluate 1e-3 > blastp_vs_dmel.outfmt6
```

```
$ blastx -query trinity.fasta \  
-db Rhodnius-prolixus-CDC_PEPTIDES_RproC3.3.fa -num_threads 8 \  
-max_target_seqs 1 -outfmt 6 -evalue 1e-3 > blastx_vs_rpro.outfmt6
```

```
$ blastp -query trinity.fasta.transdecoder.pep \  
-db Rhodnius-prolixus-CDC_PEPTIDES_RproC3.3.fa -num_threads 8 \  
-max_target_seqs 1 -outfmt 6 -evalue 1e-3 > blastp_vs_rpro.outfmt6
```

Los resultados finales de la anotación se obtuvieron cargando de cada base de datos en el archivo Trinotate.sqlite mediante los programas SQLite (<http://www.sqlite.org/>) y Trinotate, y ejecutando:

```
$ Trinotate Trinotate.sqlite report > tabla_con_anotaciones.xls
```

3.3 Mapeo de las lecturas al transcriptoma ensamblado y análisis estadístico de los resultados

Para realizar el análisis de expresión diferencial se utilizaron las lecturas correspondientes a las muestras de insectos tratados con acetona vs. los insectos tratados con deltametrina (un total de ocho muestras, correspondientes a cuatro *pools* de insectos por grupo). Se utilizó el protocolo descrito por los desarrolladores del programa Trinity en <https://github.com/trinityrnaseq/trinityrnaseq/wiki>. Antes de realizar el mapeo, se eliminó un transcripto duplicado para evitar mapeos ambiguos. Las lecturas fueron mapeadas al transcriptoma con el programa Salmon versión 0.11.1 (Patro *et al.* 2017)) dentro del *script* de Trinity “*align_and_estimate_abundance.pl*”. Los resultados obtenidos fueron analizados con el *script* del mismo paquete “*abundance_estimates_to_matrix.pl*”. Como resultado, se obtuvieron las matrices de contabilización de lecturas por transcripto en cada muestra analizada, junto con las matrices normalizadas según los métodos *Transcripts Per Million* (TPM) (Wagner *et al.* 2012) y *Trimmed Mean of M values* (TMM) (Robinson & Oshlack 2010). Posteriormente, haciendo uso del paquete de R *EdgeR Bioconductor* (McCarthy *et al.* 2012; Robinson *et al.* 2009) dentro de los *scripts* “*run_DE_analysis.pl*” y “*analyze_diff_expr.pl*” se realizó el análisis de expresión diferencial. La matriz de contabilización de lecturas por transcripto en cada muestra fue utilizada en un primer paso para obtener los análisis estadísticos de expresión diferencial mediante el método *Exact Test* (Robinson 2008). Estos resultados, junto con la matriz que contiene los valores normalizados TMM, se utilizaron para extraer los transcriptos que presentaban cambios de

expresión significativos (*False Discovery Rate* menor a 0,05 y un logaritmo del *fold change* mayor o igual a 1).

3.4 Análisis de enriquecimiento funcional de genes diferencialmente expresados

Se utilizó el programa *WEB-based Gene Set Analysis Toolkit* versión 2017 (WebGestalt) (Wang *et al.* 2017). En primer lugar, fueron obtenidas las anotaciones obtenidas por homología de las proteínas de *T. infestans* con *D. melanogaster* mediante el programa Trinotate. Estas anotaciones fueron utilizadas posteriormente para buscar los nombres de los genes correspondientes mediante una herramienta de conversión de identificadores de secuencia de FlyBase (Thurmond *et al.* 2019). La lista de genes obtenida fue sometida al análisis de WebGestalt con el método *Overrepresentation Enrichment Analysis* (ORA) utilizando las categorías no redundantes de Gene Ontology. Como referencia, se utilizó el set de datos “*genome_protein-coding*” de *D. melanogaster*.

4. Caracterización del neuropéptido ITG-like de *R. prolixus*

4.1 Insectos

Los *R. prolixus* utilizados fueron obtenidos de la colonia establecida en el Centro Regional de Estudios Genómicos (FCE-UNLP), donde son mantenidos en condiciones constantes de 60% de humedad relativa y una temperatura de 28°C, con un ciclo de luz:oscuridad de 12:12 horas. Los insectos fueron alimentados *ad libitum*, una vez por cada estadio del ciclo vital. Para su alimentación se utilizan gallinas mantenidas según las pautas establecidas por el Protocolo Nacional de Referencia Ética para estudios Biomédicos en Laboratorio, de acuerdo con los estándares internacionales relativos a la protección de animales utilizados con fines científicos.

4.2 Microdissección de tejidos

Los tejidos de ninfas de V estadio de *R. prolixus* (sistema nervioso, intestino medio anterior y posterior, recto, túbulos de Malpighi, glándulas salivales y cuerpo graso) fueron micro-disecados con pinzas quirúrgicas de titanio y hojas de afeitar bajo lupa binocular

(Zeiss 47 50 57), utilizando una solución salina modificada para *R. prolixus* (ver Anexo I). En caso de existir, los restos de sangre ingerida y/o heces contenidos en el tubo digestivo de los insectos fueron separados antes de conservar el tejido. El material se colocó en tubos tipo eppendorf con 200µl del reactivo Trizol (Thermo Fisher Scientific), y fueron conservados en un ultrafreezer a -80°C hasta su utilización. En el caso de las muestras de tejidos varios, todos los tejidos mencionados se colocaron en un mismo tubo.

4.3 Extracción de ARN y generación de cDNA

Las extracciones de ARN se realizaron con el reactivo Trizol según las instrucciones del fabricante (ver Anexo II). Las muestras se homogeneizaron de forma manual utilizando pistilos plásticos, el ARN obtenido se resuspendió en agua estéril y ultrapura. Para estimar la concentración de la muestra obtenida y asegurar su integridad se cargó 1µl de cada muestra en un gel de agarosa 1% para ser sometido a electroforesis (ver Anexo II). El ARN obtenido se almacenó en ultrafreezer a -80°C hasta su utilización.

Para la síntesis de ADN complementario (ADNc), se utilizó 1µg del ARN como molde. En primer lugar, este ARN fue tratado con la enzima DNasa I (Thermo Fisher Scientific) según las instrucciones del fabricante, para eliminar restos de ADN genómico. Posteriormente, la enzima M-MLV (Promega) fue utilizada según las instrucciones del fabricante para obtener el ADNc (ver Anexo II).

4.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADNc (RT-PCR)

Para amplificar los fragmentos de los genes *RhoprITG-like* y *RhoprActina* se utilizaron los *primers* específicos correspondientes (Tabla 2). El ADNc de cada tejido o de tejidos varios fue utilizados como molde en una reacción con volumen final de 25µl. El gen *RhoprActina* fue utilizado como control positivo de la reacción, ya que presenta una expresión constitutiva.

4.5 Generación de ARN doble cadena (ARNdc)

Se utilizó el kit *MEGAscript T7 Transcription* (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó una reacción para la síntesis de ARNdc para un fragmento del gen de *ITG-like* y para un fragmento del gen inespecífico β -lactamasa, utilizado como ARNdc para el grupo control. En ambos casos, el molde utilizado fue el

producto de PCR de un fragmento del gen, purificado desde un gel de agarosa (ver Anexo II). En el caso de *ITG-like*, la RT-PCR fue realizada a partir de ADNc de tejidos varios (descrito en 5.3). En el caso de β -lactamasa, la RT-PCR fue realizada a partir de un plásmido que contiene el gen de resistencia a ampicilina. Los primers utilizados se detallan en la Tabla 2. El producto de PCR utilizado como molde para la síntesis de ARNdc se recuperó desde un gel de agarosa 1% (ver Anexo II) y se secuenció en el servicio Macrogen (Seúl, Corea) a fin de confirmar la identidad de la secuencia.

El ARNdc fue precipitado con alcohol isopropílico y acetato de sodio (ver Anexo II) y resuspendido en 25 μ l de solución salina de *R. prolixus* filtrada (ver Anexo II). Para cuantificar el producto y controlar su integridad, se realizó una dilución 1:200 del ARNdc y se sembraron diferentes concentraciones en un gel de agarosa 1% (ver Anexo II). Posteriormente, cada muestra de ARNdc fue diluida con solución salina para obtener la concentración de 1 μ g/ μ l.

Primer	Secuencia 5'-3'	T°a
Rhopr_ITG-like_RNAi_fw	TAATACGACTCACTATAGGGATTCAGCCCAGAGATGCTGT	50°C
Rhopr_ITG-like_RNAi_rv	TAATACGACTCACTATAGGGTCACAGTCGGAGTGTCTTCG	
Rhopr_Actina_fw	ACACCCAGTTTTGCTTACGG	54°C
Rhopr_Actina_rv	GTTCGGCTGTGGTGATGA	
ARNi_Blac_Fw	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCAGTGCTGCAATGATAC	54°C
ARNi_Blac_Rv	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGAGCTGAATGAAGCCATAC	
T7 full	ATAGAATTCTCTCTAGAAGCTTAATACGACTCACTATAGGG	54°C

Tabla 2. Secuencia y temperatura de annealing (T°a) de los primers utilizados para reacciones de RT-PCR. La secuencia coloreada en rojo corresponde a la secuencia promotora requerida para la síntesis de ARN por la enzima ARN polimerasa T7.

4.6 Inyección de ARNdc

El grupo experimental fue inyectado con ARNdc de *ITG-like*, mientras que el grupo control fue inyectado con ARNdc de β -lactamasa. Para cada insecto las inyecciones fueron de 2 μ l de ARNdc en una concentración de 1 μ g/ μ l, con una microjeringa de 10 μ l con aguja de calibre 33 (Hamilton). Las inyecciones se realizaron en la parte ventral del abdomen a través de la membrana que une la coxa del tercer par de patas con la cutícula (Figura 2).



Figura 2. Sitio de inyección de ARNdc ejemplificado con una ninfa de IV estadio de *R. prolixus*.

4.7 PCR cuantitativa en tiempo real

Para comprobar la disminución en la abundancia del transcripto de *ITG-like* se utilizó la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real. Los ADNc utilizados como molde para las reacciones se generaron a partir de una mezcla de todos los tejidos blandos de cada insecto inyectado. Se comparó el nivel de expresión de *ITG-like* en los insectos inyectados con ARNdc de *ITG-like* vs. los insectos inyectados con ARNdc de β -lactamasa (control), utilizando *Rhopr β -actina* como gen de referencia (Majerowicz *et al.* 2011). Se utilizaron tres insectos por grupo, ambos genes fueron amplificados en cada muestra por triplicado en el equipo AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies). Los resultados fueron analizados con el programa Agilent AriaMx (Agilent Technologies) y posteriormente cuantificados según el método δ - δ Ct (Livak & Schmittgen 2001) para calcular la abundancia relativa de ARN mensajero en cada muestra. Las secuencias de los *primers* utilizados y su correspondiente eficiencia medida en un modelo de regresión lineal se indican en la Tabla 3. El detalle de los protocolos experimentales utilizados se describe en el Anexo II.

Primer	Secuencia 5'-3'	T°a	Eficiencia
Rhopr_ITG-like_qPCR_Fw	CTGTCCGTAATACTGCTCCT	58°C	67%; R ² =0,99
Rhopr_ITG-like_qPCR_rv	AGATCCATGCCCACCATAAC		

Rhopr_Actina_qPCR_Fw	CCATGTACCCAGGTATTGCT	58°C	74%; R ² =0,99
Rhopr_Actina_qPCR_Rv	ATCTGTTGGAAGGTGGACAG		

Tabla 3. Secuencia, temperatura de *annealing* (T°a) y eficiencia de los *primers* utilizados en reacciones de PCR en tiempo real. Las secuencias de los *primers* de β-actina fueron obtenidas de Majerowicz *et al.* 2011.

5. Ensayos fisiológicos

5.1 *Ingesta de sangre*

Los insectos se enumeraron con una tinta acrílica no tóxica y se registró su peso antes e inmediatamente después de la ingesta de sangre.

5.2 *Análisis de excreción*

Se utilizaron ninfas ayunadas de V estadio de *R. prolixus* de entre cinco y siete días post-ecdisis a las que se les inyectó ARNdc. El ensayo de excreción se realizó ocho días después de la inyección. Para analizar el volumen excretado por cada insecto, se utilizaron tubos tipo *eppendorf* pesados y numerados, y se les colocó a cada uno un insecto después de la alimentación. Transcurridas 4 horas se retiró el insecto y se registró el peso del tubo conteniendo el volumen excretado.

5.3 *Ensayo de cópula*

Los insectos fueron separados por sexo en el estadio de ninfa V a través de la observación de la genitalia. Los adultos vírgenes fueron inyectados con ARNdc entre uno y cuatro días después de transcurrida su ecdisis y alimentados luego de una semana. Pasados cinco días de haber sido alimentados fueron colocados de a pares macho/hembra en recipientes translúcidos con papel de filtro y filmados en oscuridad con cámara asistida por iluminación con luz infrarroja durante media hora. Se registró el tiempo transcurrido hasta la ocurrencia de la cópula para cada pareja.

5.4 Registro de oviposición

Los insectos utilizados para el ensayo de cópula fueron mantenidos en condiciones de cría durante 75 días posteriores al experimento. Durante ese tiempo se registró el número de huevos ovipuestos por cada hembra. El índice de fecundidad (IF) se calculó mediante la fórmula (Ruegg & Davey 1979):

$$IF = \text{número de huevos} \div (\text{peso de la hembra en ayunas (mg)} \times \text{peso de la sangre ingerida (mg)} \times 1000)$$

El peso de la sangre ingerida se estimó pesando a la hembra antes e inmediatamente después de la alimentación.

5.5 Topicación con deltametrina y registro de mortalidad

Se utilizaron ninfas de V estadio de *R. prolixus* de entre siete y diez días post-ecdisis para ser inyectadas con ARNdc. Siete días después de la inyección se realizaron las topicaciones con deltametrina (*Sigma-Aldrich*) diluida en acetona (concentración de 8,3 ng/μl; la DL₅₀ para esa la población determinada por G. Mougabure Cueto, comunicación personal), o con acetona en el caso del grupo control. Las topicaciones se realizaron dispensando 1 μl con una microjeringa Hamilton en la parte dorsal del abdomen de los insectos.

Para registrar la mortalidad, se utilizó el criterio establecido por la OMS en 1994 (Organización Mundial de la Salud/Centro de Investigaciones en Plagas e Insecticidas 1994), donde se considera muerto a un insecto si se lo coloca en un papel de filtro y éste no es capaz de desplazarse hacia uno de los extremos por sí solo o mediante la estimulación con un pincel.

6. Análisis estadístico

6.1 Pruebas de T

El análisis estadístico fue realizado con el programa IBM SPSS Statistics® versión 22. En primer lugar, se verificó que se trataba de muestras paramétricas mediante la prueba de los supuestos de normalidad y homocedasticidad, utilizando los tests estadísticos de Shapiro-Wilks y de Levene respectivamente (Kaps & Lamberson 2004; McCleery *et al.*

2007). Posteriormente, se realizó la prueba de T de dos colas, en todos los casos un valor $p < 0,05$ fue considerado como diferencia significativa (Field 2000).

6.2 *Prueba de Mantel-Cox*

El análisis de supervivencia se realizó mediante la prueba de Mantel-Cox, registrando el número de individuos muertos a lo largo del tiempo en el programa GraphPad Prism versión 5.

Capítulo 1:

Enzimas detoxificativas de xenobióticos en triatomíneos

1.1 Introducción

1.1.1 *Citocromos P450*

Los citocromos P450 (CYPs) forman parte de los genes denominados “de respuesta ambiental” que se definen como aquellos que codifican para proteínas involucradas en interacciones entre el organismo y estímulos externos. Las características distintivas de estos genes incluyen: alta diversidad, surgimiento y expansión por eventos de duplicación génica, alta tasa evolutiva, distribución en *clusters* génicos y expresión específica en condiciones fisiológicas determinadas. Todas estas características son consistentes con las respuestas a los procesos evolutivos de un ambiente que se encuentra en cambio constante (Berenbaum 2002).

Los CYPs conforman una superfamilia de enzimas conocidas principalmente por su función monooxigenasa, aunque son capaces de catalizar una gran cantidad de reacciones diferentes (Mansuy 1998; Guengerich 2001). Se encuentran en organismos muy diversos, desde bacterias hasta animales. La mayoría de los CYPs están especializados en la metabolización de compuestos endógenos, aunque también poseen un rol fundamental en el metabolismo de xenobióticos. La metabolización de un insecticida por los CYPs puede ser determinante para los eventos que suceden una vez que el compuesto entra en contacto con el insecto: contacto, penetración e interacción con el sitio blanco (Feyereisen 2012).

Los genes CYP de insectos se han clasificado en 4 clados principales: CYP2, CYP3, CYP4 y clado mitocondrial (Feyereisen 2006). A su vez, estos clados están formados por diferentes familias y subfamilias. La nomenclatura de estas enzimas se indica con la sigla CYP seguida de un número que indica el clado principal, una letra y un número indicando familia, subfamilia e isoforma respectivamente (Nelson 1998).

Se ha observado que los genes CYPs suelen estar organizados en *clusters* génicos dentro de los genomas (Feyereisen 2012). Los *clusters* son grupos de genes con secuencias conservadas y localizadas en la misma región cromosómica. Este tipo de organización es resultado de eventos de duplicación secuencial, que generan expansiones génicas. En el caso de algunas subfamilias de CYPs esto se ha denominado “*bloom*”. Se han observado *clusters* en CYPs relacionados a detoxificación y resistencia a insecticidas en diferentes especies de insectos, tales como *M. domestica* (Kasai & Scott 2001), *A. gambiae* (Nikou *et al.* 2003), *D. melanogaster* (Daborn *et al.* 2007) y *Helicoverpa zea* (Sasabe *et al.* 2004) así como expansiones génicas, por ejemplo, de la subfamilia

CYP156AS de *A. mellifera*, la CYP6A en *D. melanogaster*, o la CYP6BQ de *Tribolium castaneum*, entre otras (Feyereisen 2011).

1.1.1.1 Clado mitocondrial y CYP2

El clado mitocondrial puede dividirse en dos grupos: uno conservado, asociado a funciones fisiológicas esenciales como el metabolismo de ecdisteroides (genes *Halloween: 302A (disembodied;dib)*, *314A (shadow; shd)* y *315A (sad)*); y un grupo de genes parálogos, con expansiones específicas en cada especie que presentan un tasa de evolución elevada. En este último grupo se encuentra por ejemplo la familia 12, involucrada en el metabolismo de xenobióticos y relacionada con el fenómeno de resistencia en dípteros (Bogwitz *et al.* 2005; David *et al.* 2005; Good *et al.* 2014; Guzov *et al.* 1998). El clado CYP2 de insectos contiene las familias CYP15, CYP18, y varias de la serie CYP300. Algunas de ellas están involucradas en funciones conservadas. La cantidad de genes pertenecientes a los clados mitocondrial y CYP2 en los organismos estudiados hasta ahora es relativamente estable, por lo que se ha planteado que es probable que queden pocas familias sin identificar dentro de estos (Feyereisen 2012).

1.1.1.2 Clado CYP3

El clado CYP3, habitualmente organizado en *clusters*, es el más abundante en insectos. Genes de las familias CYP6 y CYP9 dentro de este clado han sido asociadas al metabolismo de xenobióticos y resistencia a insecticidas (Feyereisen 2006).

1.1.1.3 Clado CYP4

El clado CYP4 ha sido el menos estudiado dentro de la superfamilia de los CYPs en insectos; sus miembros presentan una gran diversidad entre sí. La familia 4 de este clado ha sido relacionada con el metabolismo de xenobióticos y el fenómeno de resistencia a insecticidas (Amichot *et al.* 1998; Killiny *et al.* 2014; Pittendrigh *et al.* 1997; Pridgeon *et al.* 2003; Wan *et al.* 2013), incluso en insectos triatomíneos (Grosso *et al.* 2016; Traverso *et al.* 2017). Otros miembros tienen un rol en diversas funciones fisiológicas conservadas, como por ejemplo vías biosintéticas (Maïbèche-Coisne *et al.* 2000) y de procesamiento de olores (Maïbèche-Coisne *et al.* 2005; Maïbèche-Coisne *et al.* 2002).

1.1.2 *Carboxil/Colinesterasas*

La reacción que catalizan las esterasas es la hidrólisis de un éster en un alcohol y un ácido, que abarca la hidrólisis de una amplia gama de sustratos carboxílicos. Las proteínas que componen esta familia son funcional y estructuralmente diversas. Aún comparando entre especies de insectos filogenéticamente cercanas es posible encontrar porcentajes de identidad muy bajos entre secuencias ortólogas (Oakeshott *et al.* 1999).

De acuerdo a su capacidad de catálisis y su localización, las carboxil/colinesterasas (CCEs) se clasifican en tres grupos: a) neuro/desarrollo, que contiene los clados I-N, se compone de proteínas secretadas, generalmente asociadas a membrana y sin actividad catalítica con la excepción de la acetilcolinesterasa; b) procesamiento de hormonas y feromonas, que contiene los clados D-H, se compone de proteínas que son en su mayoría secretadas y catalíticas; y c) la clase dietaria (clados A-C) contiene enzimas catalíticas con localizaciones celulares y subcelulares diversas (Oakeshott *et al.* 2005).

Mientras que algunas CCEs pertenecientes a las clases dietaria y de procesamiento de hormonas y feromonas tienen un rol importante en la defensa de los organismos frente a xenobióticos, otras están involucradas en el metabolismo de hormonas y feromonas específicas (Oakeshott *et al.* 2005). Los mecanismos por los cuales algunas esterasas están involucradas en los procesos de resistencia a insecticidas piretroides, organofosforados y carbamatos son diversos: incremento en el número de copias de genes (Field & Devonshire 1997; Karunaratne *et al.* 1998; Raymond *et al.* 1998; Vontas *et al.* 2000), expresión génica aumentada (Field 2000; Field & Devonshire 1998; Hawkes & Hemingway 2002; Hemingway *et al.* 1998), mutaciones específicas en su secuencia (Campbell *et al.* 1998; Claudianos *et al.* 1999; Whyard *et al.* 1995; Zhu *et al.* 1999) o una combinación de estos mecanismos (Li *et al.* 2007).

1.1.3 *Glutación Transferasas*

Las Glutación Transferasas (GSTs) catalizan la conjugación de compuestos electrofílicos a glutatión reducido, convirtiendo al producto resultante en una molécula más soluble y por lo tanto excretable (Habig *et al.* 1974). Además, algunas de ellas catalizan la deshidrocloración utilizando glutatión reducido como cofactor (Clark & Shamaan 1984). El alto grado de conservación de estas enzimas en insectos sugiere que se encuentran involucradas en procesos fisiológicos esenciales.

Según su localización celular, las GSTs se clasifican en microsomales y citosólicas. Las primeras son estructuralmente diferentes al resto de las GSTs y aunque catalizan reacciones similares (Prabhu *et al.* 2001; Toba & Aigaki 2000) no han sido involucradas con el metabolismo de insecticidas. Las GSTs citosólicas se clasifican en las clases Sigma, Zeta, Theta, Omega, Epsilon y Delta (Board *et al.* 1997, 2000; Ranson *et al.* 2001). Las dos últimas se encuentran exclusivamente en insectos y se ha propuesto que cumplen roles importantes en la adaptación de las especies al ambiente (Ranson *et al.* 2002). Las evidencias disponibles apuntan a un rol importante de estas dos clases en la resistencia a los insecticidas (revisado en Li *et al.* 2007). También se ha propuesto que la clase Omega podría tener un papel en este fenómeno (Yamamoto *et al.* 2009).

Según el tipo de insecticida del que se trate y de las clases involucradas, el rol de las diferentes GSTs en la respuesta a xenobióticos es diverso (revisado en Pavlidi *et al.* 2018). Participan en la degradación de organofosforados (Syvanen *et al.* 1996; Ranson *et al.* 2001), organoclorados (Huang *et al.* 1998) y piretroides (Vontas *et al.* 2001, 2002). Aunque el mecanismo aún no ha sido dilucidado, se ha planteado que puede deberse al secuestro del insecticida mediante su unión a la molécula tóxica (Prapanthadara *et al.* 1998; Jirajaroenrat *et al.* 2001; Kostaropoulos *et al.* 2001; Wilding *et al.* 2014). Otro mecanismo de acción propuesto consiste en la protección frente al estrés oxidativo que se produce por la intoxicación (Vontas *et al.* 2001; Yamamoto *et al.* 2009).

Como se ha observado en otras superfamilias de enzimas detoxificativas, es frecuente la agrupación de genes codificantes para GSTs en *clusters*, lo que podría evidenciar duplicaciones recientes o selección natural por proximidad genómica y eficiencia en la producción de estas enzimas (Friedman 2011). Por otra parte, y en particular para las clases Delta y Epsilon, los análisis filogenéticos entre las diferentes especies han evidenciado la aparición de nuevos genes GST y la inactivación o eliminación de otros (lo que se conoce como *birth-and-death evolution*, propuesto por Nei & Rooney en 2005, mostrando un recambio de los genes de estas clases consistente con su rol detoxificativo frente a una gran variedad de compuestos (Friedman 2011).

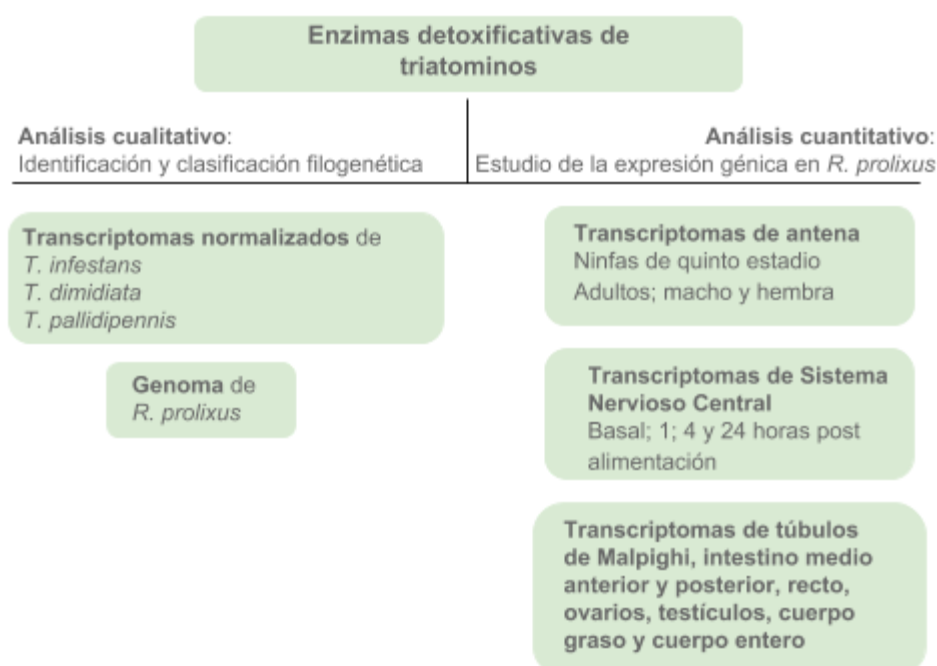
1.2 Hipótesis

Las enzimas involucradas en la detoxificación de insecticidas presentan secuencias y funciones conservadas en insectos. Por ello es posible identificar y anotar el complemento de familias génicas asociadas a la detoxificación en triatominos mediante búsquedas por homología en bases de datos y análisis filogenéticos.

1.3 Objetivos específicos

- Caracterizar el repertorio de genes codificantes para las enzimas CYP, CCE y GST, relacionadas a la metabolización de xenobióticos en triatominos.
- Evaluar la expresión de estos genes en diferentes tejidos del insecto *R. prolixus* a fin de obtener indicios sobre su posible función.

1.4 Resumen de la metodología utilizada



1.5 Resultados y discusión

1.5.1 Citocromos P450

Una búsqueda por homología en transcriptomas de *Triatoma* spp. y en el genoma de *R. prolixus* reveló la presencia de 87 transcriptos de CYPs en *T. dimidiata*, 94 en *T. infestans*, 113 en *T. pallidipennis* y 119 en *R. prolixus*. La cantidad de genes hallada en estos triatominos supera a la reportada para otras especies tales como *A. pisum* (64), *D. melanogaster* (88) y *A. mellifera* (46) (Tabla 1.1). A continuación se analiza la distribución de estos transcriptos en los diferentes clados de la superfamilia de los CYPs.

Clado	<i>R. prolixus</i>	<i>T. dimidiata</i>	<i>T. infestans</i>	<i>T. pallidipennis</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>An. gambiae</i>	<i>A. mellifera</i>	<i>A. pisum</i>
Mitocondrial	8	3	6	6	11	9	6	8
Familias	CYP301, 302, 314, 315, 394, 404	CYP301, 394, 404	CYP301, 302, 315, 404	CYP301, 302, 315, 394, 404	CYP12,49,301, 302, 314,315	CYP12,49, 301, 302, 314,315	CYP301, 302, 314, 315, 334	CYP301, 302, 314, 315, 353
CYP2	7	6	1	8	7	10	8	10
Familias	CYP15, 18, 303, 305, 306, 307	CYP15, 306, 307	CYP303	CYP15, 18, 303, 306, 307	CYP18, 303-307	CYP15, 303-307	CYP15, 18, 303, 305-307, 342, 343	CYP15, 18, 303, 305-307
CYP3	55	59	65	69	36	40	28	23
Familias	CYP6, 395, 3084-3092, 3096	CYP6, 395, 3084-3092	CYP6, 395, 3084-3091	CYP6, 395, 3084-3092	CYP6, 9, 28, 308-310, 317	CYP6, 9, 329	CYP6, 9, 336	CYP6
CYP4	49	19	22	30	32	46	4	23
Familias	CYP4, 3093	CYP4, 3093	CYP4, 3093	CYP4, 3093	CYP4, 311-313, 316, 318	CYP4, 325	CYP4	CYP4, 380
Total	119	87	94	113	88	105	46	64

Tabla 1.1. Número de genes identificados en la superfamilia CYP en el genoma de *R. prolixus* y en los transcriptomas de *T. infestans*, *T. dimidiata* y *T. pallidipennis* en comparación con otras especies de insectos. Los números provienen de Claudianos et al. (2006), Feyereisen et al. (2006, 2012), Oakeshott et al. (2010), Ramsey et al. 2010 y de <http://drnelson.uthsc.edu/aphid.htm>.

1.5.1.1 CYP2 y clado mitocondrial

En las bases de datos de triatominos estudiadas, los genes CYP mitocondriales están representados por 8 transcriptos en *R. prolixus*, 6 en *T. infestans*, 6 en *T. pallidipennis* y 3 en *T. dimidiata* (Figura 1.1 A, Tabla 1.1). Si bien se encontraron varias secuencias ortólogas de genes ya identificados en otras especies (como por ejemplo *Drome-dib*, *Drome-shd*, *Drome-sad* y *Drome-301a1*) ningún transcripto identificado en triatominos se agrupó con la familia 12 que ha sido relacionada con resistencia a insecticidas (Figura 1.1 A), lo que sugiere la ausencia o baja representación de esta familia en este grupo.

Rprodib (RPRC011595) y el ortólogo de *Drome301a1* (RPRC001745) fueron los transcriptos más expresados en las antenas de *R. prolixus* (Figura 1.2 A), mientras que RPRC009414 fue el más expresado en sistema nervioso (Figura 1.2 A). Este transcripto también se mostró como el más expresado en los transcriptomas de distintos tejidos de *R. prolixus* (buche, intestino medio posterior, recto, ovarios, testículos, túbulos de Malpighi) generadas por Oliveira *et al.* (Tabla Suplementaria S1.1 en Anexo I).

En cuanto al clado CYP2, se encontraron algunos ortólogos de las familias 307A (*Spook/Spookier*) y 306A (*Phantom*) del grupo de genes *Halloween*, involucrados en la biosíntesis de ecdisteroides (Figura 1.1 B) (Niwa *et al.* 2004; Warren *et al.* 2004; Namiki *et al.* 2009). Los genes RPRC009370 (*R. prolixus*) y TRIPA_CYP2_07 (*T. pallidipennis*) se identificaron como ortólogos del gen *Drome-18a1*. La familia CYP15 está representada por los transcriptos RPRC000513, TRIDI_CYP2_05 y TRIPA_CYP2_03, la familia 305 se encuentra representada por RPRC001301 y la familia CYP303 por los transcriptos RPRC000592, TRIIN_CYP2_01 y TRIPA_CYP2_02 (Figura 1.1 B).

La expresión de la mayoría de los genes CYP2 fue baja en las bases de datos de *R. prolixus* analizadas (Figura 1.2 B). Los ortólogos de los genes *Drome-18a1* y *Drome-305a1* fueron los más expresados en antena, especialmente en larvas de V estadio (Figura 1.2 B). La expresión de RPRC009377, relacionada filogenéticamente a *Drome-phm*, parece disminuir en el sistema nervioso luego de la ingestión de sangre, mientras que la expresión de CYP18A y CYP15A varía a lo largo de los diferentes tiempos post-alimentación (Figura 1.2 B). Estos resultados podrían apuntar a un rol de algunos genes en los procesos fisiológicos que se disparan en triatominos por la ingesta de sangre, tales como diuresis, muda en ninfas y reproducción en adultos.

1.5.1.2 El clado CYP3

El clado CYP3 es el más representado dentro de la superfamilia CYP en las bases de datos analizadas: 55 genes en *R. prolixus*, 65 en *T. infestans*, 59 en *T. dimidiata* y 69 en *T. pallidipennis*. Esto constituye una expansión respecto a *D. melanogaster* (36), *An. gambiae* (40), *A. mellifera* (28) y *A. pisum* (23).

Los genes del clado CYP3 en las bases de datos de triatominos analizadas se encuentran agrupados en las familias 6, 395, 3084, 3085, 3086, 3087, 3088, 3089, 3090, 3091, 3092 y 3096 (Figura 1.1 C). Los CYP3 de las familias 3084-3092 habían sido descritos sólo en *R. prolixus* (Schama *et al.* 2016), por lo que estos resultados indican que estos CYP están presentes en otros triatominos. Entre las familias identificadas, las que tienen más miembros son la CYP395 (14 transcriptos en *R. prolixus*, 10 en *T. dimidiata*, 10 en *T. infestans* y 22 en *T. pallidipennis*), la CYP6 (8 transcriptos en *R. prolixus*, 9 en *T. dimidiata*, 15 en *T. infestans* y 9 en *T. pallidipennis*) y la CYP3084 (10 transcriptos en *R. prolixus*, 13 en *T. dimidiata*, 10 en *T. infestans* y 10 en *T. pallidipennis*) (Figura 1.1 C). Se identificaron algunas secuencias que no pudieron ser clasificadas unívocamente a través del abordaje filogenético, probablemente por corresponder a transcriptos parciales.

No se detectaron transcriptos pertenecientes a la familia CYP9 en triatominos (Figura 1.1 C). Este hecho llama particularmente la atención, puesto que CYP9 es una de las familias CYP con mayor número de miembros en otros genomas de insectos estudiados (Feyereisen 2012). Dentro del clado CYP3, las familias 6 y 9 han sido relacionadas con la respuesta a insecticidas (revisado en Feyereisen 2012). La carencia o disminución en el número de integrantes de la familia CYP9 en triatominos sugiere que CYP6 sería la única familia de las reportadas como detoxificativas dentro del clado 3 que participaría en la detoxificación de xenobióticos en estas especies (Feyereisen 2012). Sin embargo, la inducción observada en CYPs de las familias 3085 y 3092 luego de la topicación con deltametrina en poblaciones de *T. infestans* resistentes y susceptibles a piretroides podría indicar que estos genes están involucrados en procesos detoxificativos (Grosso *et al.* 2016; Dulbecco *et al.* 2018).

Se ha propuesto que la duplicación de genes CYP podría facilitar el reclutamiento de nuevos miembros para una función fisiológica especializada (Feyereisen 2005). En *R. prolixus* se encontraron 32 miembros del clado 3 (pertenecientes a las familias 395, 3084, 3085, 3086, 3087, 3089, 3090, 3091 y 3092) organizados en diferentes *clusters*. Los *supercontigs* KQ035657, KQ034396, KQ034255 y KQ034131 de *R. prolixus* contienen 3 genes CYP3 cada uno. El *supercontig* KQ034742 contiene 5 genes mientras que KQ034121

contiene 6 genes CYP3. El cluster más numeroso fue hallado en el supercontig KQ034111, que contiene 9 genes, todos ellos pertenecientes a la familia CYP395 (www.vectorbase.org).

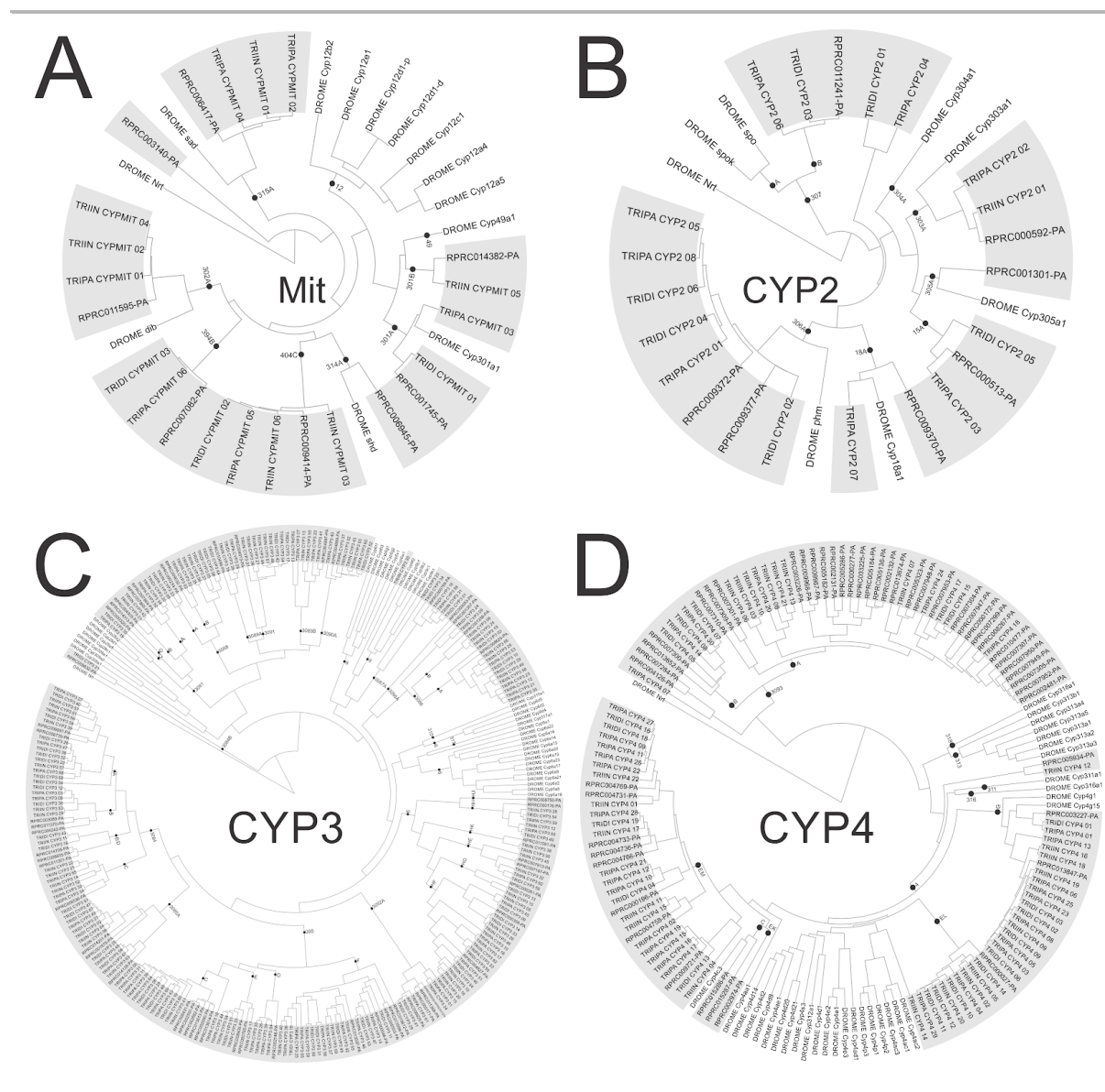


Figura 1.1. Árboles filogenéticos de la superfamilia de Citocromos P450 de *R. prolixus* (código de identificación correspondiente a VectorBase), *T. infestans* (TRIIN), *T. dimidiata* (TRIDI), *T. pallidipennis* (TRIPA) y *D. melanogaster* (DROME). **A)** Filogenia del clado mitocondrial. **B)** Filogenia del clado CYP2. **C)** Filogenia del clado CYP3. **D)** Filogenia del clado CYP4. La secuencia de la proteína Neurotactina de *D. melanogaster* (código FlyBase CG9704) se utilizó como *outgroup*. Las secuencias de triatominos se encuentran marcadas en gris.

En las bases de datos transcriptómicas de antena se encontraron miembros de las familias CYP395, CYP3086, CYP3087, CYP3088, CYP3091 y CYP3096 con una alta expresión (Figura 1.2 C). Algunos de estos genes del clado CYP3 podrían estar involucrados en el procesamiento de olores y/o feromonas, tal como se observó en algunos miembros de esta familia en *D. melanogaster* (Younus *et al.* 2014) y *Spodoptera littoralis* (Pottier *et al.* 2012). En el sistema nervioso de *R. prolixus*, se encontró una alta expresión de RPRC007864 y RPRC007865 (CYP3091), RPRC011370 (CYP3084), RPRC014201 (CYP3085), y RPRC009053 (CYP3096) (Figura 1.2 C). Con algunas excepciones, se encontraron miembros de la familia CYP395 con alta expresión tanto en antena como en sistema nervioso (Figura 1.2 C). La mayoría de los genes CYP3 se vieron altamente expresados en intestino medio anterior, gónadas y recto, y menos representados en túbulos de Malpighi, intestino medio posterior y cuerpo graso (Tabla Suplementaria S1.2 en Anexo I).

1.5.1.3 El clado CYP4

Dentro de este clado, la familia 4 es la única que ha sido relacionada con la resistencia a insecticidas (Pridgeon *et al.* 2003; Scharf *et al.* 2001). Otras familias se han asociado a diferentes funciones biosintéticas (Maïbèche-Coisne *et al.* 2000) y de procesamiento de olores (Maïbèche-Coisne *et al.* 2005; Maïbèche-Coisne *et al.* 2002). En el presente análisis se encontraron un total de 49 genes en *R. prolixus*, 22 en *T. infestans*, 19 en *T. dimidiata* y 30 en *T. pallidipennis* para el clado CYP4 (Tabla 1.1). El número de genes dentro de este clado es similar al descrito en otros genomas de insectos (32 en *D. melanogaster*, 46 en *An. gambiae* y 23 en *A. pisum*) (Tabla 1.1). El análisis indicó que en los triatomíneos analizados los transcriptos CYP4 pertenecen a las familias 4 (14 de *R. prolixus*, *T. infestans* y *T. dimidiata*, y 24 de *T. pallidipennis*) y 3093 (Figura 1.1 D), que hasta hoy había sido descrita sólo en *R. prolixus* (Schama *et al.* 2016). Esta última parece estar expandida en esta especie en la que se hallaron 32 miembros, mientras que también se encontró representada en los otros triatomíneos (5 miembros en *T. dimidiata* y *T. pallidipennis* y 7 miembros en *T. infestans*). La expansión observada podría explicarse por eventos de duplicación génica en *R. prolixus*, ya que 22 transcriptos se agrupan en 3 *clusters*: 6 genes se ubican en el supercontig KQ034611 (RPRC007947, RPRC007948, RPRC007949, RPRC007950, RPRC007952, RPRC007953), 7 genes en el supercontig KQ034366 (RPRC000277, RPRC002131, RPRC002132, RPRC005136, RPRC005182, RPRC005184, RPRC005286) y 9 genes en el supercontig KQ034480 (RPRC007299, RPRC007300, RPRC007301, RPRC007304, RPRC007305, RPRC007307, RPRC007309, RPRC007310,

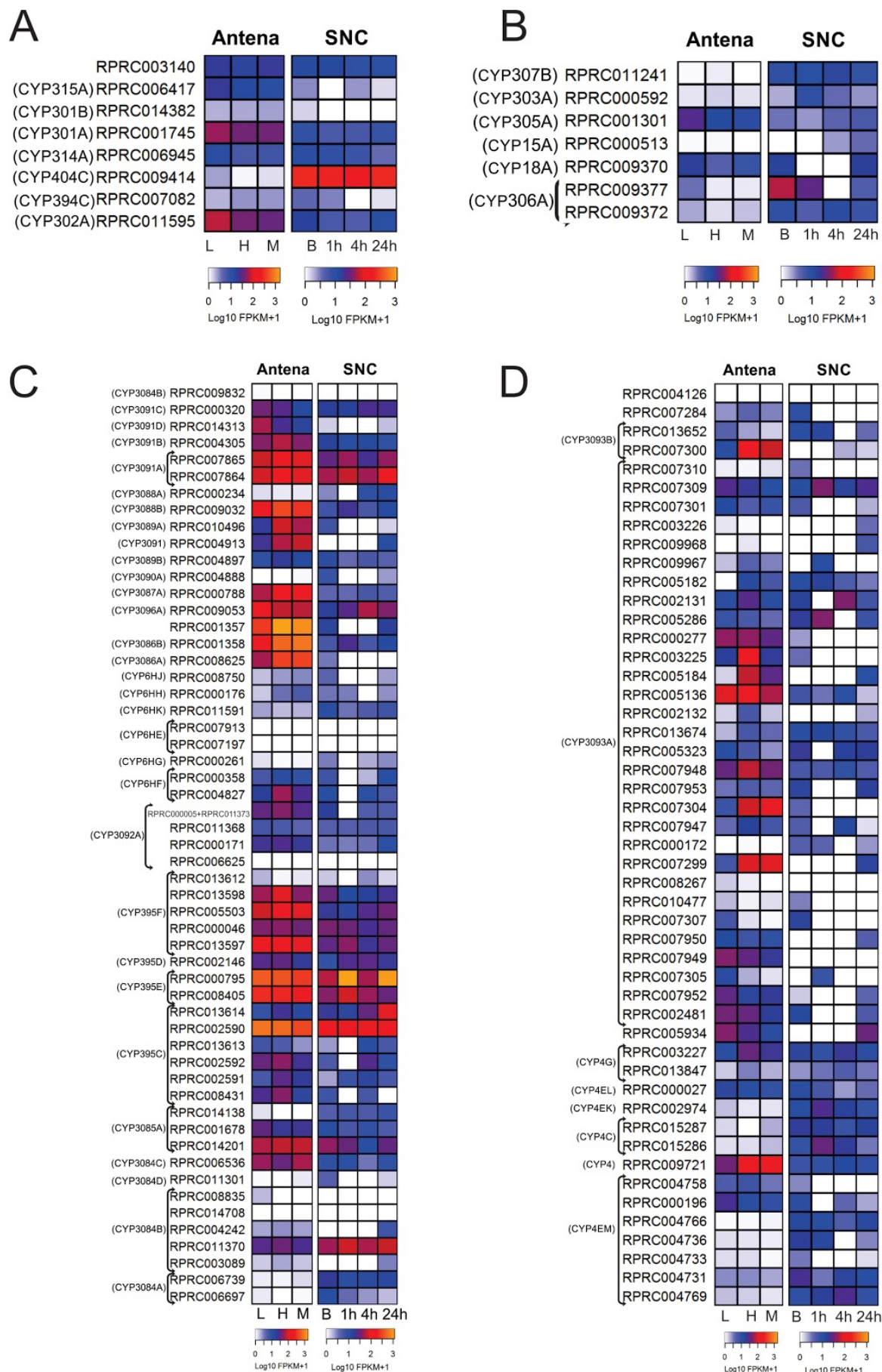


Figura 1.2. Comparación de los niveles de expresión en antena y sistema nervioso central (SNC) de *R. prolixus* en diferentes condiciones. A) Clado mitocondrial. B) Clado CYP2. C) Clado CYP3. D) Clado CYP4. Izquierda: niveles de expresión en antenas de larva (L) y hembra (F) y macho (M) adultos. Derecha: niveles de expresión en sistema nervioso central de insectos adultos en condiciones basales, 1, 4 y 24 horas luego de la ingesta de sangre. Los niveles de expresión (representados como Log10 FPKM+1) se grafican con una escala de color, en la que blanco representa el nivel de expresión más bajo, y amarillo el más alto. La clasificación filogenética de los genes (obtenida de Schama *et al.* 2016) se muestra a la izquierda.

RPRC002481). Debido a que los CYPs hallados en *clusters* a menudo se han relacionado a resistencia a insecticidas (Daborn *et al.* 2007; Kasai & Scott 2001; Nikou *et al.* 2003; Sasabe *et al.* 2004), estos miembros podrían participar en procesos detoxificativos en *R. prolixus*.

El análisis del perfil de expresión de los genes CYP4 en los transcriptomas analizados indica que algunos miembros de la familia CYP3093 y el transcripto RPRC009721 están altamente expresados en antenas de adultos (Figura 1.2 D). Varios genes de la familia CYP4 también se encontraron sobreexpresados en antenas de *D. melanogaster* (Younus *et al.* 2014). Existen datos experimentales que indican un rol en la degradación de olores y/o feromonas para estas enzimas en insectos (Maïbèche-Coisne *et al.* 2005; Pottier *et al.* 2012). Teniendo en cuenta esta información y los perfiles de expresión observados (Figura 1.2 D), podría proponerse un rol de algunos genes CYP4 en la degradación de feromonas sexuales en *R. prolixus*. Por último, la expresión de la mayoría de los genes CYP4 en los transcriptomas de los otros tejidos analizados es baja o moderada (Figura 1.2 D y Tabla Suplementaria S1.3 en Anexo I), lo que reforzaría una posible función antenal.

1.5.2 Carboxil/colinesterasas

En el genoma de *R. prolixus* se encontró una expansión en el número de genes pertenecientes a esta superfamilia (61) en comparación con los transcriptomas de *Triatoma* spp. (19 en *T. infestans*, 27 en *T. dimidiata* y 18 en *T. pallidipennis*) y en los genomas de otros insectos (35 en *D. melanogaster*, 51 en *An. gambiae*, 24 en *A. mellifera* y 30 en *A. pisum*) (Tabla 1.2; Figura 1.3).

Clase/c lado	<i>R.</i> <i>prolixus</i>	<i>T.</i> <i>dimidiata</i>	<i>T.</i> <i>infestans</i>	<i>T.</i> <i>pallidipennis</i>	<i>D.</i> <i>melanogaster</i>	<i>An.</i> <i>gambiae</i>	<i>A.</i> <i>mellifera</i>	<i>A.</i> <i>pisum</i>
Clase dietaria								

Clado A	0	0	0	0	0	0	5	5
Clado B	0	0	0	0	13	16	3	0
Clado C	0	0	0	0	0	0	0	0
Clase de procesamiento de hormonas y feromonas								
Clado D	0	0	0	0	3	0	1	0
Clado E	40	25	18	17	2	4	2	18
Clado F	0	0	0	0	3	6	2	0
Clado G	0	0	0	0	0	4	0	0
Clase de neuro/desarrollo								
Clado H	2	1	0	1	5	10	1	0
Clado I	1	0	0	0	1	1	1	1
Clado J	2	0	1	0	1	2	2	2
Clado K	1	0	0	0	1	1	1	1
Clado L	13	1	0	0	4	5	5	3
Clado M	2	0	0	0	2	2	1	0
Total	61	27	19	18	35	51	24	30
Tabla 1.2. Número de genes identificados en la superfamilia CCE en el genoma de <i>R. prolixus</i> y en los transcriptomas de <i>T. infestans</i>, <i>T. dimidiata</i> y <i>T. pallidipennis</i> en comparación con otras especies de insectos. Los números provienen de Claudianos <i>et al.</i> (2006), Oakeshott <i>et al.</i> (2010) y Ramsey <i>et al.</i> 2010.								

La distribución de los transcriptos pertenecientes a las diferentes clases de CCEs en triatominos es muy diferente a lo reportado para otras especies de insectos. Resulta destacable la ausencia de transcriptos pertenecientes a la clase dietaria. Por otra parte, la mayoría de los transcriptos detectados se agrupan en el clado E, perteneciente a la clase de procesamiento de hormonas y feromonas (Tabla 1.2; Figura 1.3). Una posible explicación a la ausencia de enzimas de la clase dietaria en triatominos podría ser su hematofagia obligada, lo que hace que no deban enfrentarse a compuestos secundarios de las plantas. La ausencia de enzimas de la clase dietaria podría repercutir en la capacidad detoxificativa en triatominos. Sin embargo, en *T. infestans* ha sido reportada la actividad piretroide esterasa (Santo Orihuela *et al.* 2008), evidenciada por la fluorescencia emitida al producirse el clivaje de moléculas similares a la permetrina (Santo Orihuela *et al.* 2006). Ello sugiere que algunas CCEs de la clase de procesamiento de hormonas y feromonas podrían actuar en la detoxificación de piretroides, tal como se vio en otras especies (Oakeshott *et al.* 2005; Claudianos *et al.* 2006).

1.5.2.1 Clase de procesamiento de hormonas y feromonas

Las carboxilesterasas involucradas en el procesamiento de hormonas y feromonas se encuentran agrupadas en los clados D, E F y G (Oakeshott *et al.* 2005, 2010). Al igual que en el áfido *A. pisum* (Ramsey *et al.* 2010), los triatominos muestran una reducción en la diversidad de esta clase. Todas las CCEs de triatominos identificadas en la clase “Procesamiento de hormonas y feromonas” pertenecen al clado E (40 en *R. prolixus*, 18 en *T. infestans*, 25 en *T. dimidiata* y 17 en *T. pallidipennis*) (Figura 1.3), lo cual resulta una expansión con respecto a otros genomas de insectos (2 genes en *D. melanogaster* y *A. mellifera*, y 4 en *An. gambiae*) (Tabla 1.2). Los genes de *R. prolixus* parecen ser producto de eventos de duplicación génica, debido a su distribución en *clusters*. Se encontraron un total de 29 transcriptos en 5 *supercontigs* del genoma: KQ035483 y KQ034057 codifican 3 genes cada uno, KQ034091 y KQ034212 codifican 5 genes cada uno, y KQ034279 codifica 12 genes.

La mayoría de los miembros del clado E muestra baja expresión en los transcriptomas de antena analizados (Figura 1.4). Sin embargo, los genes RPRC003733, RPRC007919, RPRC007702 y RPRC003806, y algunos de los incluidos en los *supercontigs* KQ034057 (RPRC003619 y RPRC003578) presentan altos niveles de expresión en estos transcriptomas, y expresión relativamente baja en las otras bases de datos estudiadas (Figura 1.4 y Tabla Suplementaria S1.4 en Anexo I). Los resultados apuntan a un rol de estos transcriptos en el procesamiento de moléculas de olor.

En los transcriptomas de sistema nervioso se detectó una expresión alta de los genes RPRC003619, RPRC007919, RPRC007700, RPRC003606, RPRC003806, RPRC010261 y RPRC004681 (Figura 1.4).

1.5.2.2 Clase relacionada a neuro/desarrollo

Se detectaron 21 transcriptos de esta clase en el genoma de *R. prolixus*, de los cuales 13 pertenecen al clado L (neuroliginas), 2 al clado H (glutactinas), 1 al clado K (gliotactina), 1 al clado I (no caracterizado) 2 al clado M (neurotactinas) y 2 al clado J (acetilcolinesterasas) (Tabla 1.2, Figura 1.3). Estos números son comparables a lo observado en otras especies, con la excepción del clado L que presenta una expansión en *R. prolixus* (Tabla 1.2 y Figura 1.3). En las *Triatoma* spp. estudiadas, se identificó un número bajo de transcriptos pertenecientes a esta clase: 1 CCE del clado J en *T. infestans*; 1 del clado H y 1 del clado L en *T. dimidiata*; y 1 del clado H para *T. pallidipennis* (Figura 1.3).

El transcripto RPRC005626 (clado I) y los transcriptos RPRC002814 (clado H), RPRC013515 (clado M) y RPRC005115 (clado K) se hallaron altamente expresados en

antena (Figura 1.4), con una expresión relativamente baja en otros tejidos (Anexo I, Tabla Suplementaria S1.4). En los transcriptomas de sistema nervioso, varios genes pertenecientes a los clados H y L se encontraron altamente expresados (Figura 1.4).

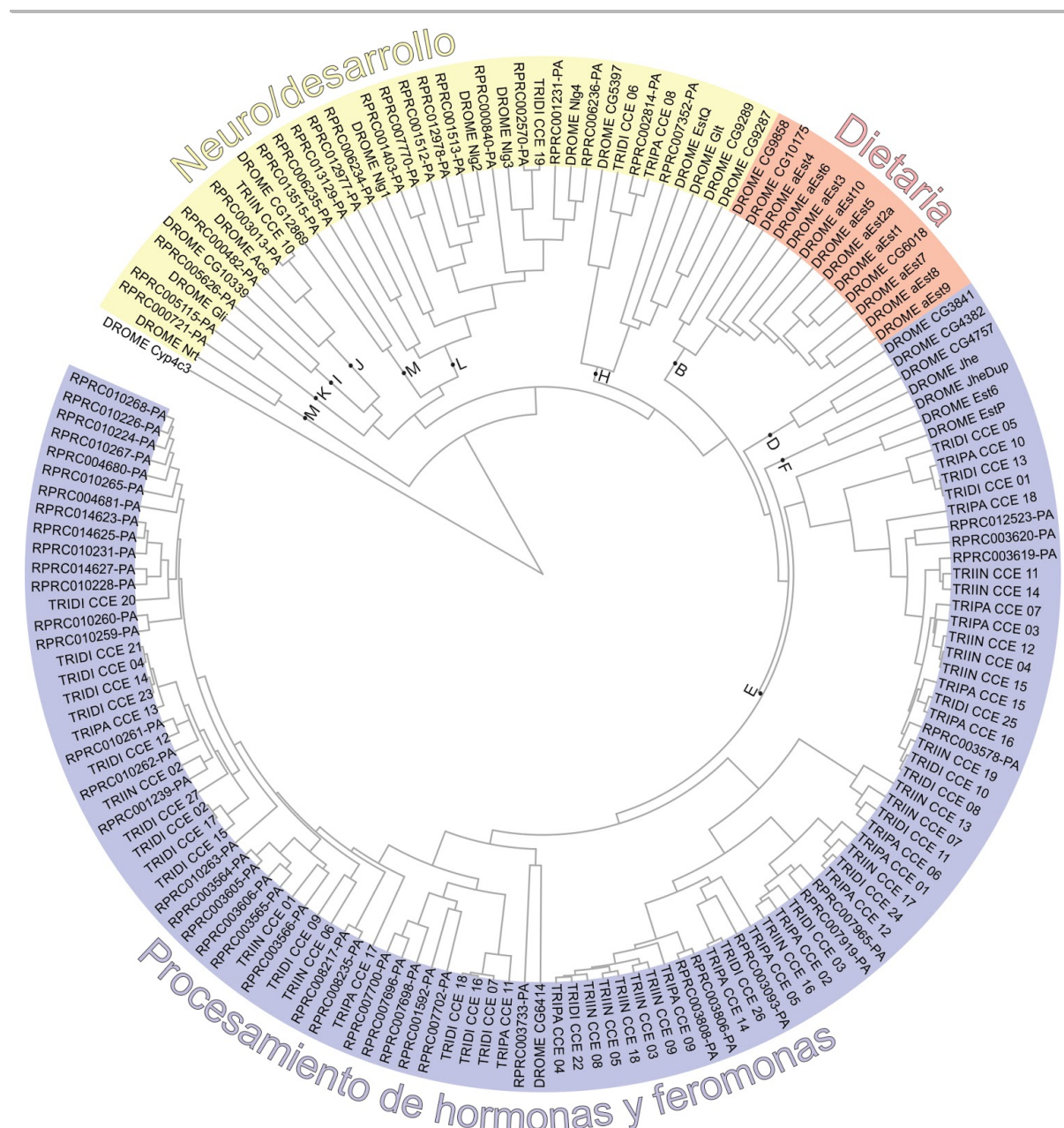


Figura 1.3. Árbol filogenético de la familia de Carboxil/colinesterasas de *R. prolixus* (código de identificación correspondiente a VectorBase), *T. infestans* (TRIIN), *T. dimidiata* (TRIDI), *T. pallidipennis* (TRIPA) y *D. melanogaster* (DROME). La secuencia de la Cyp4c3 de *D. melanogaster* (código FlyBase CG14031) se utilizó como outgroup. Las letras ubicadas al lado de los puntos en las ramas indican la delimitación de cada clado.

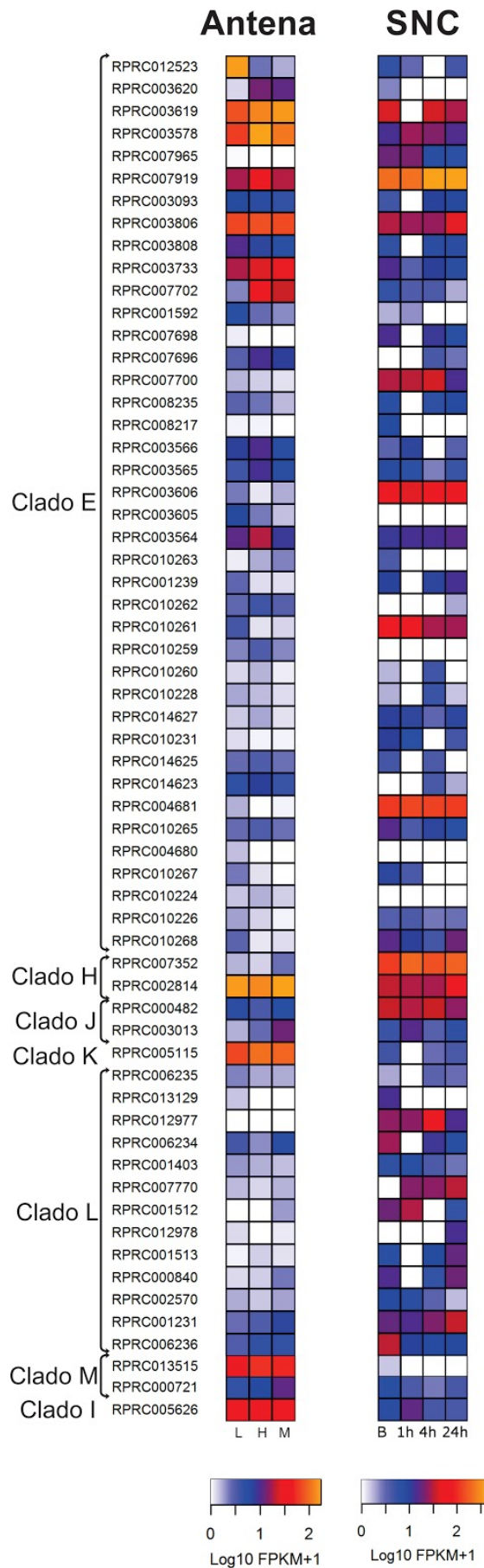


Figura 1.4. Comparación de los niveles de expresión de CCEs en antena y sistema nervioso central (SNC) de *R. prolixus* en diferentes condiciones. Izquierda: niveles de expresión en antenas de larva (L) y hembra (F) y macho (M) adultos. Derecha: niveles de expresión en sistema nervioso central de insectos adultos en condiciones basales, 1, 4 y 24 horas luego de la ingesta de sangre. Los niveles de expresión (representados como Log10 FPKM+1) se grafican con una escala de color, en la que blanco representa el nivel de expresión más bajo, y amarillo el más alto. La clasificación filogenética de los genes se muestra a la izquierda.

1.5.3 Glutación Transferasas

Los genes pertenecientes a esta superfamilia parecen estar subrepresentados en los transcriptomas de *T. infestans*, *T. dimidiata* y *T. pallidipennis* (14, 22 y 11 transcriptos respectivamente), así como en el genoma de *R. prolixus* (14) cuando se los compara con otros genomas de insectos (Tabla 1.3).

Clase	<i>R. prolixus</i>	<i>T. dimidiata</i>	<i>T. infestans</i>	<i>T. pallidipennis</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>An. gambiae</i>	<i>A. mellifera</i>	<i>A. pisum</i>
Delta	1	1	1	1	11	17	2	16
Epsilon	0	0	0	0	14	8	0	1 (0) *
Omega	1	2	0	1	4	1	2	2
Sigma	7	13	9	5	1	1	4	6
Theta	3	2	2	1	4	2	1	2
Zeta	1	1	0	1	2	1	1	0
Microsomal	1	3	2	2	3	3	2	2
Desconocidas	0	0	0	0	1	2	1	3
Subtotal	14	22	14	11	40	35	13	32

Tabla 1.3. Número de genes identificados en la superfamilia GST en el genoma de *R. prolixus* y en los transcriptomas de *T. infestans*, *T. dimidiata* y *T. pallidipennis* en comparación con otras especies de insectos. Los números provienen de Claudianos *et al.* (2006), Oakeshott *et al.* (2010), Ramsey *et al.* 2010 y Shi *et al.* (2012). (*) Shi *et al.* (2012) halló una GST de la clase Epsilon en *A. pisum* mientras que Ramsey *et al.* (2010) no halló GSTs de la clase Epsilon en dicha especie.

1.5.3.1 GSTs de la clase Delta y Epsilon

Al analizar las GSTs de las clases Delta y Epsilon de diferentes especies de insectos se observa una amplia diversificación, consistente con su rol en la detoxificación de compuestos variables (Friedman *et al.* 2011). Esto podría ser importante en la adaptación de las especies a sus ambientes específicos, tal como fue sugerido para *D. melanogaster* y *A. gambiae* (Ranson *et al.* 2002). La clase Delta está altamente representada en los genomas de *D. melanogaster*, *An. gambiae* y *A. pisum* (11, 17 y 16 miembros, respectivamente). La clase Epsilon está representada por 14 miembros en *D. melanogaster* y por 8 en *An. gambiae*, mientras que se encuentra ausente en *A. mellifera*; los reportes en la literatura para *A. pisum* son contradictorios (Ramsey *et al.* 2010; Shi *et al.* 2012) (Tabla 1.3). En el presente trabajo de Tesis Doctoral se ha encontrado sólo 1 miembro de la clase Delta y no se han hallado miembros de la clase Epsilon en las especies de triatomíneos analizadas (Tabla 1.3 y Figura 1.5). Teniendo en cuenta el rol clave de estas enzimas en la metabolización del DDT (Lumjuan *et al.* 2005; Aravindan *et al.* 2014), y que este insecticida

es muy poco eficaz para triatominos (Zerba 1999), los resultados podrían sugerir que en triatominos el DDT no sería metabolizado por esta familia enzimática.

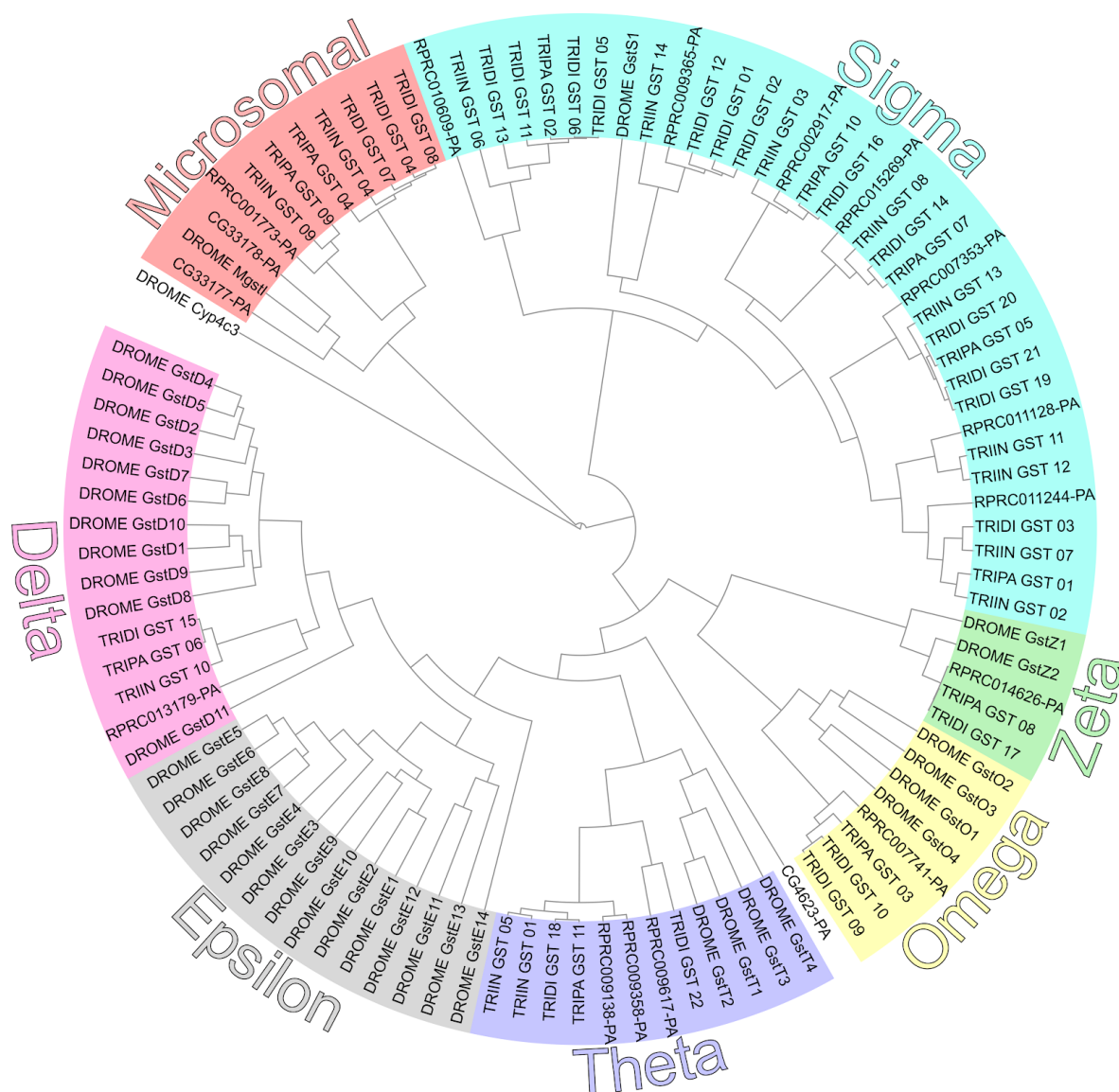


Figura 1.5. Árbol filogenético de la familia de Glutathion Transferasas de *R. prolixus* (código de identificación correspondiente a VectorBase), *T. infestans* (TRIIN), *T. dimidiata* (TRIDI), *T. pallidipennis* (TRIPA) y *D. melanogaster* (DROME). La secuencia de la *Cyp4c3* de *D. melanogaster* (código FlyBase CG14031) se utilizó como outgroup.

El gen perteneciente a la clase Delta evidenció una baja expresión en recto y ausencia de expresión en otros tejidos (Figura 1.6 y Tabla Suplementaria S1.5 en Anexo I). Sin embargo, este gen se halló altamente expresado en los transcriptomas de antena

(Figura 1.6), lo cual podría indicar un rol en la degradación de moléculas de olor en *R. prolixus*, tal como se observó en antenas de *Manduca sexta* (Rogers *et al.* 1999).

1.5.3.2 GSTs de la clase Sigma

Al igual que lo observado en *A. mellifera*, la clase Sigma es la más abundante en triatominos dentro de la superfamilia de las GSTs, con 7 representantes en *R. prolixus*, 9 en *T. infestans*, 13 en *T. dimidiata* y 5 en *T. pallidipennis* (Tabla 1.3, Figura 1.5). En contraste, se encuentra reducida en *D. melanogaster* y *An. gambiae*, que poseen sólo un representante, mientras que en *A. pisum* se han encontrado 6 (Tabla 1.3). En *R. prolixus*, el único caso de duplicación génica para la superfamilia parece ser el de los genes RPRC011244 y RPRC011128 de la clase Sigma, localizados en el *supercontig* KQ034372. La sobre-representación de la clase Sigma en triatominos podría reflejar un rol frente al estrés oxidativo causado por la hidrólisis de la hemoglobina y la liberación de moléculas citotóxicas asociadas a la ingesta de sangre (Graça-Souza *et al.* 2006).

El gen RPRC011244 se encontró altamente expresado en cuerpo graso, túbulos de Malpighi, recto y ovario (Anexo I, Tabla Suplementaria S1.5). En el sistema nervioso, los transcritos más expresados fueron RPRC010609, RPRC015269 y RRPC007353 (Figura 1.6). Éste último también presentó una alta expresión en las estructuras digestivas y gónadas (Anexo I, Tabla Suplementaria S1.5). Todas las enzimas de esta clase, con excepción de RPRC010609 y RPRC011244, se encontraron altamente expresadas en antena de manera homogénea entre sexos y los distintos estadios del desarrollo analizados (Figura 1.6).

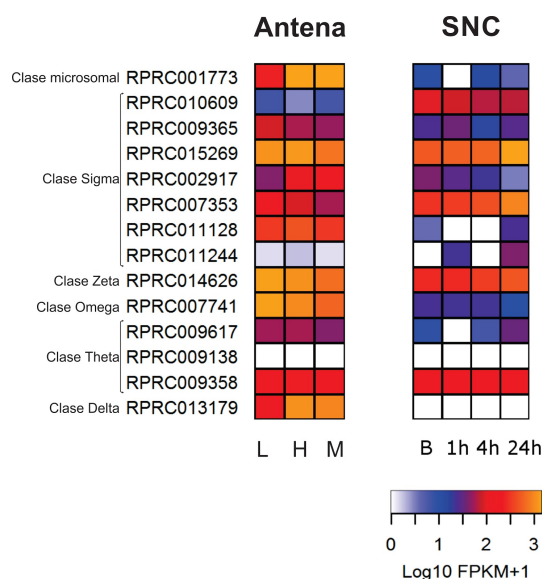


Figura 1.6. Comparación de los niveles de expresión de GSTs en antena y sistema nervioso central (SNC) de *R. prolixus* en diferentes condiciones. Izquierda: niveles de expresión en antenas de larva (L) y hembra (F) y macho (M) adultos. Derecha: niveles de expresión en sistema nervioso central de insectos adultos en condiciones basales, 1, 4 y 24 horas luego de la ingesta de sangre. Los niveles de expresión (representados como Log10 FPKM+1) se grafican con una escala de color, en la que blanco representa el nivel de expresión más bajo, y amarillo el más alto. La clasificación filogenética de los genes se muestra a la izquierda.

1.5.3.3 GSTs de la clase Omega

Ningún transcripto de la clase Omega fue detectado en *T. infestans*, mientras que se encontró un único transcripto en *T. pallidipennis* y *R. prolixus* y dos en *T. dimidiata* (Figura 1.5). Esto es similar a lo observado en otras especies de insectos, con la excepción de *D. melanogaster* que posee 4 GSTs de esta clase (Tabla 1.3). La expresión de GST Omega se detectó en las antenas, estructuras digestivas y gónadas de *R. prolixus* a niveles relativamente altos (Figura 1.6, Tabla Suplementaria S1.5 en Anexo I).

1.5.3.4 GSTs de las clases Zeta y Theta

Para la clase Theta se hallaron 3 transcriptos en *R. prolixus*, 2 en *T. dimidiata* y *T. infestans* y sólo 1 en *T. pallidipennis* (Figura 1.5). Los genes GST Theta RPRC009617 y RPRC009358 se encontraron expresados en antenas y sistema nervioso (Figura 1.6), mientras que la expresión de RPRC009138 fue alta en estructuras digestivas y gónadas (Anexo I, Tabla Suplementaria S1.5). La clase Zeta estuvo representada por un único transcripto en los triatominos estudiados con la excepción de *T. infestans*, donde no fue detectada (Tabla 1.3, Figura 1.5). De manera similar, sólo se ha encontrado un representante de esta familia en las especies *A. mellifera* y *An. gambiae*, mientras que *D.*

melanogaster posee 2. La clase Zeta se encuentra ausente en *A. pisum* (Tabla 1.3). El gen que representa a esta clase en *R. prolixus* (RPRC014626) estuvo altamente expresado en antenas y sistema nervioso (Figura 1.6).

1.5.3.5 GSTs microsomales

Estas enzimas no se han relacionado al metabolismo de insecticidas. En las especies estudiadas, se encuentran representadas por 1 transcripto en *R. prolixus*, 3 en *T. dimidiata*, y 2 tanto en *T. infestans* como en *T. pallidipennis*; estos números son similares a los observados en otros insectos (Tabla 1.3 y Figura 1.5).

1.5 Conclusiones

- Los resultados apuntan a una reducción de miembros de las superfamilias de enzimas detoxificativas en triatominos, en comparación con genomas de otras especies de insectos. Se destaca la ausencia de la clase Epsilon y la identificación de un sólo miembro de la clase Delta en la superfamilia de GSTs; la ausencia de la familia CYP12 del clado mitocondrial y la ausencia de la familia CYP9 en el clado 3 dentro de la superfamilia CYPs; y la ausencia de la clase dietaria en la superfamilia de CCEs.
- Ciertas familias se hallaron expandidas en triatominos en comparación con otras especies. Es el caso del clado CYP3, el clado E de CCEs y la clase Sigma de GSTs. Esto podría indicar un repertorio detoxificativo cualitativamente diferente en triatominos en relación a otras especies, sumado a que hasta hoy ciertos CYP han sido hallados exclusivamente en triatominos (CYP3084-3093 y CYP3096).
- Dada la importancia que tienen los genes organizados en *clusters* en la resistencia a insecticidas, nuestros resultados permiten proponer aquellos genes que forman *clusters* en *R. prolixus* como candidatos interesantes para el estudio de la función detoxificativa en triatominos.

- Los patrones de expresión de los genes analizados permitieron en algunos casos plantear como hipótesis su papel en procesos fisiológicos determinados, particularmente en la degradación de olores en aquellos altamente expresados en antenas.

Capítulo 2:

Análisis del neuropeptidoma de triatominos

2.1 Introducción

2.1.1 Estructura de los neuropéptidos

Los neuropéptidos son mensajeros químicos que poseen funciones regulatorias en procesos fisiológicos tales como la osmorregulación, desarrollo, reproducción, comportamiento y respuesta al estrés en los insectos. Constituyen el grupo más diverso de moléculas de señalización, tanto desde el punto de vista estructural como funcional (Scherkenbeck & Zdobinsky 2009). Los neuropéptidos se producen en su mayoría en células neurosecretoras del sistema nervioso central y en las interneuronas, y más raramente en motoneuronas o en neuronas sensoriales (Nässel 2002; Nässel & Homberg 2006; Nässel *et al.* 2008). Pueden ser detectados en células endocrinas del tracto digestivo o en otros sitios periféricos (Ewer & Reynolds 2002; Nässel 2002). Los principales sitios de liberación de hormonas peptídicas producidas en las células neurosecretoras son la corpora cardíaca y la corpora allata, los órganos periviscerales (asociados con el cordón nervioso ventral), así como las terminaciones axonales de la aorta anterior, los nervios periféricos, el intestino y los músculos de la pared del cuerpo (Predel *et al.* 2004). Por lo tanto, los péptidos pueden actuar como hormonas circulantes o como neurohormonas locales que se liberan dentro del sistema nervioso, o en los músculos o glándulas (Altstein & Nässel 2010).

Los precursores de neuropéptidos están codificados en el genoma como prepropéptidos que sufren una serie de clivajes post-traduccionales, para dar lugar a uno o varios péptidos maduros, denominados paracopias. Los péptidos resultantes son de dos tipos: 1) péptidos *core*, los cuales están conservados filogenéticamente y se asume que poseen la actividad biológica, y 2) los péptidos espaciadores, que presentan secuencias no conservadas y cuyo rol no ha sido estudiado en profundidad (Wegener & Gorbashov 2008).

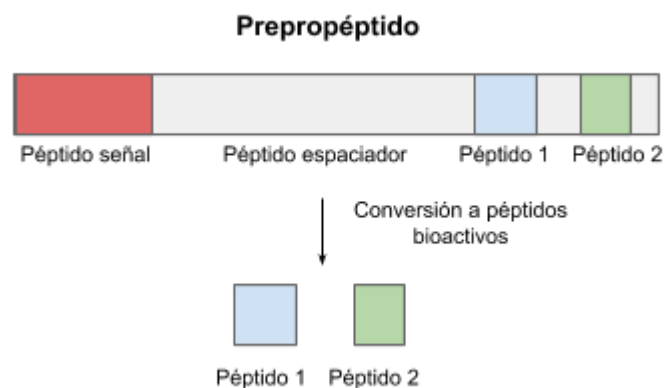


Figura 2.1. Representación esquemática del procesamiento típico de un neuropéptido. Los prepropéptidos sufren la remoción del péptido señal resultando en propéptidos, que son procesados por enzimas proteolíticas para liberar los péptidos biológicamente activos. Luego de las modificaciones post-traduccionales subsiguientes son almacenados en vesículas para su liberación (Adaptado de Nässel y Larhammar, 2013).

Por tratarse de proteínas de excreción, los precursores de neuropéptidos poseen en su región N-terminal una secuencia hidrofóbica llamada “péptido señal” (Figura 2.1). Los péptidos maduros están flanqueados dentro de la secuencia por sitios de clivaje dibásicos o monobásicos que dirigen el corte por endopeptidasas (Scheller *et al.* 1983, 1984; Scheller & Kirk 1987; Taghert 1999; Veenstra 2000). El procesamiento de un prepolipéptido puede dar lugar a un solo péptido maduro o varias copias conservadas, o liberar péptidos con diferentes secuencias (Figura 2.1). Además, muchos neuropéptidos en insectos son modificados post-traduccionamente por medio de amidaciones, oxidaciones, etc. (Zupanc 1996; Kolhekar *et al.* 1997; Predel *et al.* 1999) lo que hace necesarias las aproximaciones de espectrometría de masas para confirmar la identidad de los productos maduros (Ons 2017). Durante el proceso de maduración, los neuropéptidos son transportados a vesículas para su liberación (Zupanc 1996; Karhunen *et al.* 2001).

La mayoría de los neuropéptidos ejercen su acción a través de la interacción con un receptor acoplado a proteína G, aunque algunos lo hacen a través de receptores de tipo tirosina-kinasa o guanilato-ciclasa (Zupanc 1996; Hewes & Taghert 2001; Vanden Broeck 2001).

2.1.2 Sistema neuroendocrino de triatominos

La existencia de una regulación hormonal de los procesos fisiológicos en *R. prolixus* se conoce hace más de medio siglo (Maddrell 1962, 1964; Wigglesworth 1964), sin embargo recién en 2008 se reportó la primer secuencia de un gen codificante para un neuropéptido en esta especie (Paluzzi *et al.* 2008). El advenimiento de nuevas tecnologías para el estudio de secuencias proteicas y nucleotídicas permitió desde entonces profundizar en el conocimiento sobre los neuropéptidos de esta especie, en la que se han identificado hasta el momento más de 40 familias de neuropéptidos. Asimismo, se han realizado aproximaciones experimentales para el estudio de la función de varias de ellas, lo que ha permitido una caracterización neuroendocrina exhaustiva en comparación con otras especies (revisado en Ons 2017).

Los neuropéptidos cumplen roles diversos en los insectos. Existen evidencias que sugieren un rol de ciertos neuropéptidos en procesos de diuresis y antidiuresis en *R. prolixus* así como en otras especies (Coast 2009; Nässel & Winther 2010; Sterkel *et al.* 2011; Paluzzi 2012). Entre ellos se encuentran la hormona diurética CRF (CRF-DH, *Corticotropin releasing factor-like diuretic hormone*) que es el factor diurético más potente identificado hasta la fecha en *R. prolixus* (Te Brugge *et al.* 2009, 2011), y la Calcitonina (CT-DH, *Calcitonin-like diuretic hormone*) que presenta una actividad diurética menos potente (Te Brugge *et al.* 2005). Asimismo, existen estudios que sugieren que la alatotropina (AT) podría ser un factor diurético en triatominos (Villalobos-Sambucaro *et al.* 2015). Por el contrario, un péptido conservado generado a partir del precursor *Capability* (CAPA) de *R. prolixus* demostró poseer actividad antidiurética (Paluzzi *et al.* 2008; Ianowski *et al.* 2009; Paluzzi 2012). En el genoma de *R. prolixus* fueron identificados los genes parálogos *RhoprCAPAa* y *RhoprCAPAb* (Paluzzi *et al.* 2008; Paluzzi & Orchard 2010). Estos precursores codifican tanto los péptidos CAPA como los péptidos pirokinina (PK), mientras que un segundo precursor codifica sólo para péptidos tipo PK en *R. prolixus* (Ons *et al.* 2010), aunque no se han reportado estudios fisiológicos sobre ellos hasta la fecha. Otros neuropéptidos que han demostrado tener actividad diurética o antidiurética en insectos son la kinina (Hayes *et al.* 1994; Holman *et al.* 1999; Radford *et al.* 2004), la neuroparsina A (NPAA) (Fournier *et al.* 1994; Girardie *et al.* 1998) y el péptido transportador de iones (ITP, *ion transport peptide*) (Audsley *et al.* 1992), aunque en *R. prolixus* aún no se han reportado estudios sobre los últimos dos. En cuanto a la kinina, esta no ha mostrado ningún efecto diurético o antidiurético en *R. prolixus* (Te Brugge & Orchard 2002; Donini *et al.* 2008; Te Brugge *et al.* 2009), aunque podría estar relacionada con la regulación de la alimentación (Te Brugge & Orchard 2002; Te Brugge *et al.* 2009; Sterkel *et al.* 2011; Bhatt *et al.* 2014). En

nuestro grupo de trabajo, recientemente se ha encontrado evidencia que sugiere que CCHa, un neuropéptido poco estudiado en insectos, posee un papel dual en la diuresis en *R. prolixus*, con un efecto diurético sobre túbulos de Malpighi y antidiurético sobre buche (Capriotti 2018).

La ecdisis en insectos también es un proceso regulado de forma precisa por neuropéptidos. Las hormonas peptídicas que regulan la ecdisis descritas hasta ahora son la hormona disparadora de la ecdisis (ETH), la hormona de la eclosión (EH), corazonina (CZ) y el péptido cardio-acelerador de crustáceos (CCAP) (Zitnan & Adams 2012). Además, nuestro grupo de trabajo ha demostrado recientemente que las orcokinininas (OK) también actúan como reguladores de la ecdisis en *R. prolixus* (Wulff *et al.* 2017, 2018).

El dominio C-terminal RF-amida, presente en los neuropéptidos miosupresina (MS), péptidos tipo FMRFa (FLPs), sulfakininas (SK), neuropéptido corto F (sNPF) y neuropéptido largo F (NPF), se ha relacionado a diferentes funciones en insectos; varios de ellos demostraron ser cardioactivos (Rasmussen *et al.* 2015). Algunos de estos péptidos poseen características inusuales en sus secuencias en *R. prolixus* en comparación con otros insectos (Ons *et al.* 2016). En el mismo sentido, la variación en algunos de estos péptidos también fue evidenciada en los hemípteros *C. lectularius*, *Nezara viridula* y *Halyomorpha halys*, que presentan algunas de estas secuencias inusuales para SK y MS (Lavore *et al.* 2018; Predel *et al.* 2018).

Respecto a la regulación de los procesos metabólicos, la hormona adipokinética (AKH) actúa en insectos estimulando reacciones catabólicas tales como movilización de lípidos y carbohidratos (Kodrik 2008). Esta hormona también se encuentra implicada en la respuesta al estrés oxidativo, que entre otros factores puede ser causado por los insecticidas (revisado en Kodrík *et al.* 2015). En nuestro grupo de trabajo hemos encontrado una expresión mayor de este neuropéptido en *T. infestans* tratados con el piretroide deltametrina (Sierra 2018). En *R. prolixus*, los estudios *in vivo* apuntan a un rol de esta hormona en la movilización de lípidos desde el cuerpo graso a la hemolinfa (Patel *et al.* 2014; Zandawala *et al.* 2015; Alves-Bezerra *et al.* 2016).

Las alatostatinas (AST) de insectos incluyen FGL-amida AST (también conocida como AST-A), el péptido mioinhibitorio (MIP, también llamado AST-B), AST-C, AST-CC y AST-CCC (Stay & Tobe 2006; Veenstra 2016). De acuerdo a experimentos fisiológicos, se ha propuesto un rol en la coordinación visceral y del músculo cardíaco para el péptido FGL AST de *R. prolixus* (Zandawala *et al.* 2012; Zandawala & Orchard 2013) y efectos mioinhibitorios para el péptido RhoprMIP (Lange *et al.* 2012; Sedra *et al.* 2015).

Las proctolinas (PRL) son neuropéptidos altamente conservados en insectos. Se ha demostrado *in vitro* que PRL estimula la contracción del recto, intestino medio anterior y aorta en *R. prolixus* (Orchard *et al.* 2011).

En los últimos años, las nuevas herramientas bioinformáticas han permitido la identificación de nuevas familias de neuropéptidos tales como NPLP1, NVP-like, ITG-like, RYamida y CNMamida. Sin embargo, no todas han sido estudiadas a nivel funcional, por lo que el papel de muchos de estos neuropéptidos en insectos es todavía desconocido. Se ha observado una modulación de la liberación de *RhoprITG-like* y *RhoprNVP-like* luego de la ingesta de sangre en *R. prolixus* (Sterkel *et al.* 2011). Por otra parte, en nuestro grupo de trabajo se ha hallado una expresión aumentada de ITG-like y NVP-like en una población de *T. infestans* resistente a deltametrina, en comparación con una población susceptible de referencia (Traverso *et al.* 2016). Sin embargo, son necesarios estudios funcionales para dilucidar el rol de estas moléculas.

De acuerdo a la definición propuesta por Hauser (Hauser *et al.* 2010) los neuropéptidos de insectos se pueden agrupar en un conjunto “basal”, cuyos componentes están presentes de manera consistente en los genomas de todas las especies estudiadas, y un conjunto “variable”, compuesto por neuropéptidos que han sido detectados sólo en ciertos genomas. Se ha propuesto que los componentes del conjunto basal intervienen en funciones fundamentales para la supervivencia, mientras que los del grupo variable regularían adaptaciones específicas a un nicho ecológico particular. Hasta el momento, los precursores de la inotocina, del NPLP2-4, del péptido sexual, de la trisina y de la hormona protoracicotrópica (PTTH) no han sido detectados mediante aproximaciones genómicas, transcriptómicas o proteómicas en *R. prolixus*. El caso de PTTH resulta llamativo, dado que se ha sugerido su actividad e inmunoreactividad en *R. prolixus* (Vafopoulou *et al.* 2007; Vafopoulou & Steel 2014). Sin embargo, PTTH no ha sido detectado en hemípteros por aproximaciones genómicas, transcriptómicas o peptidómicas hasta la fecha, con la excepción de *Nilaparvata lugens*, *A. pisum* y *Cimex lectularius* (Tanaka *et al.* 2014; Barberà & Martínez-Torres 2017; Predel *et al.* 2018).

2.1.3 Potencial de los neuropéptidos como moléculas blanco para el control de insectos perjudiciales

Dado su rol en la regulación de procesos fundamentales para la biología de los insectos, los neuropéptidos y sus receptores se han propuesto como una fuente de nuevos blancos para el desarrollo de insecticidas selectivos para una especie o grupo de especies.

Estas moléculas podrían proveer la especificidad necesaria para evitar los problemas generados por los insecticidas de amplio espectro sobre especies benéficas y otras desventajas asociadas a los neurotóxicos en uso (Verlinden *et al.* 2014; Audsley & Down 2015). La utilización de peptidomiméticos estables (Nachman *et al.* 2011, 2012) y el uso de la técnica de ARNi para el silenciamiento de genes del sistema neuroendocrino (Bendena 2010) podrían proveer herramientas interesantes en la búsqueda de nuevas estrategias de control basadas en blancos endocrinos.

Un paso esencial para explorar nuevos blancos es la caracterización del neuropeptidoma de las especies a nivel estructural. Es decir, describir qué genes precursores de neuropéptidos se encuentran presentes en un genoma y su secuencia nucleotídica. Dado que hasta el momento el único triatomino cuya información genómica se encuentra disponible es *R. prolixus* (Mesquita *et al.* 2015), en este trabajo hemos analizado las secuencias de neuropéptidos identificadas en los transcriptomas de *T. infestans*, *T. dimidiata* y *T. pallidipennis* con el fin de aportar información útil para experimentación en fisiología molecular y potencialmente en la búsqueda de nuevos blancos para el control de esta subfamilia de insectos.

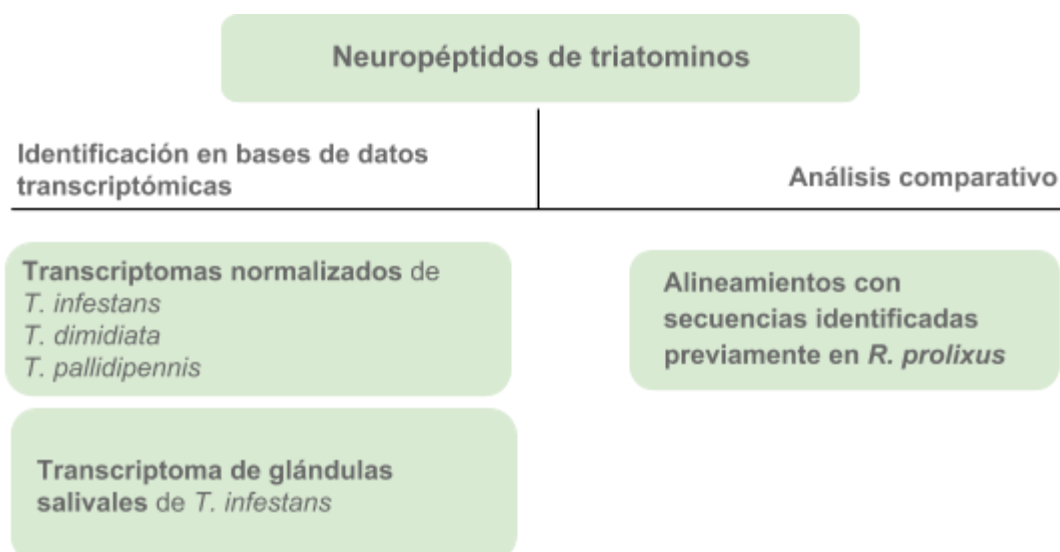
2.2 Hipótesis

Las secuencias que codifican para los precursores de los neuropéptidos se encuentran conservadas en insectos. Mediante un análisis por homologías en bases de datos suficientemente completas puede caracterizarse el complemento neuropeptídico de una especie.

2.3 Objetivos específicos

- Identificar los genes precursores de neuropéptidos expresados en transcriptomas de *T. infestans*, *T. dimidiata* y *T. pallidipennis*.
- Analizar las secuencias de los neuropéptidos identificadas en los triatominos estudiados y compararlas con las descritas en otras especies de insectos a fin de establecer particularidades.

2.4 Resumen de la metodología utilizada



2.5 Resultados y discusión

En las bases de datos transcriptómicas estudiadas (ver Materiales y métodos, punto 1.1.1) se encontraron un total de 19 precursores de neuropéptidos en *T. infestans*, 15 en *T. dimidiata* y 13 en *T. pallidipennis*. En todos los casos en que se identificó el marco abierto de lectura completo, se halló el mismo número de paracopias de péptidos *core* y de espaciadores en las *Triatoma* spp. que los descritos para *R. prolixus*. Ello revela un alto grado de conservación en la estructura de los precursores de neuropéptidos en triatomíneos. La menor cantidad de transcriptos encontrados en los transcriptomas de *Triatoma* spp. en comparación con el genoma de *R. prolixus* puede explicarse por el hecho de que en el primer caso la detección de la secuencia depende del nivel de expresión de los genes, lo que no ocurre en la secuenciación del genoma. En el mismo sentido, la reconstrucción de secuencias completas a partir de transcriptomas puede resultar dificultosa, lo que explica que en algunos casos solo se cuente con información parcial. A continuación, se detallan los péptidos encontrados en las diferentes especies, agrupados según su rol fisiológico de acuerdo a la evidencia disponible.

2.5.1 Neuropéptidos involucrados en la diuresis y antidiuresis

En las bases de datos transcriptómicas estudiadas, hemos identificado CT-DH en *T. dimidiata* y *T. pallidipennis*; AT en *T. infestans* y *T. pallidipennis*; CRF-DH, CAPA, PK e ITP en *T. infestans*, mientras que NPAA fue encontrado en las tres *Triatoma* spp. (Figura 2.2). Vale destacar que los precursores de TriinPK y TriinITP fueron detectados también en el transcriptoma de glándulas salivales de *T. infestans* (www.vectorbase.org). Esto coincide con la expresión del receptor de ITP reportada en la garrapata *Rhipicephalus microplus* (Yang *et al.* 2015), lo que podría sugerir un rol relacionado a la producción o excreción de saliva en artrópodos hematófagos. Finalmente, hemos detectado transcriptos de CCHa en todos los transcriptomas analizados (Figura 2.1).

conservadas con propiedades muy similares y el punto (.) indica una sustitución semiconservada con propiedades poco similares (Sievers *et al.* 2014).

En las bases de datos transcriptómicas analizadas, encontramos precursores de orckininas (en sus isoformas OKA y OKB) y ETH en los tres transcriptomas de *Triatoma* spp. (Figura 2.3). En la mayoría de los insectos, incluyendo *R. prolixus* y los hemípteros *N. viridula* y *H. halys* (Lavore *et al.* 2018), el dominio C-terminal del péptido bioactivo de ETH posee el motivo VPRX-amida conservado, (X=Ile o Leu) (Roller *et al.* 2010). Sin embargo, para las tres especies de *Triatoma* spp. analizadas se encontró el motivo LPRI (Figura 2.3) en dicha región. Este motivo sólo había sido detectado hasta el momento en el hemíptero *Nilaparvata lugens* (Roller *et al.* 2010).

Figura 2.3. Alineamiento múltiple de secuencias de neuropéptidos involucrados en el desarrollo post-embionario de *T. infestans* (TRIIN), *T. dimidiata* (TRIDI) y *T. pallidipennis* (TRIPA). Las secuencias de *R. prolixus* (RHOPR) fueron utilizadas como referencia. Los sitios de clivaje por convertasas, predichos de acuerdo a los criterios propuestos por Veenstra (2000) se indican en **negrita**. Los residuos de glicina sombreados en gris indican una predicción de sitios de amidación. La línea punteada representa el péptido señal predicho. El doble subrayado indica los péptidos encontrados por LC-MS/MS en Traverso *et al.* (2016). En la última línea de cada alineamiento el asterisco (*) indica un residuo completamente conservado, los dos puntos (:) indican sustituciones conservadas con propiedades muy similares y el punto (.) indica una sustitución semiconservada con propiedades poco similares (Sievers *et al.* 2014).

2.5.3 Neuropéptidos RF-amida

En las bases de datos transcriptómicas se ha identificado el marco abierto de lectura completo de sNPF en las tres *Triatoma* spp. estudiadas (Figura 2.4). Al igual que lo observado para algunos hemípteros como *N. viridula*, *H. halys* (Lavore *et al.* 2018) y *R. prolixus*, la secuencia para este neuropéptido es mucho más corta que las ortólogas descritas en la mayoría de los insectos (Nässel & Wegener 2011). En cuanto al precursor de MS, se ha observado que *TridiMS* posee las mismas características inusuales que *R. prolixus* en el péptido conservado QDIDHVFMRFa (Sterkel *et al.* 2011) (Figura 2.4), que en la mayoría de los insectos contiene un residuo de Leucina o Valina en la tercera posición, y presenta un extremo C-terminal con la secuencia FLRFa. En otras especies de insectos incluyendo hemípteros como *C. lectularius*, *N. viridula* y *H. halys* (Predel *et al.* 2018; Lavore *et al.* 2018) no se ha observado el extremo C-terminal FMRFa inusual observado en *R. prolixus* y evidenciado en este trabajo para *T. dimidiata*. Estos resultados plantean una interesante hipótesis de conservación a nivel de subfamilia que podrá ser contrastada con información de secuencia en otras especies evolutivamente cercanas.

[illegible]

Figura 2.4. Alineamiento múltiple de secuencias de neuropéptidos RF-amida de *T. infestans* (TRIIN), *T. dimidiata* (TRIDI) y *T. pallidipennis* (TRIPA). Las secuencias de *R. prolixus* (RHOPR) fueron utilizadas como referencia. Los sitios de clivaje por convertasas, predichos de acuerdo a los criterios propuestos por Veenstra (2000) se indican en negrita. Los residuos de glicina sombreados en gris indican una predicción de sitios de amidación. La línea punteada representa el péptido señal predicho. El doble subrayado indica los péptidos encontrados por LC-MS/MS en Traverso *et al.* (2016). En la última línea de cada alineamiento el asterisco (*) indica un residuo completamente conservado, los dos puntos (:) indican sustituciones conservadas con propiedades muy similares y el punto (.) indica una sustitución semiconservada con propiedades poco similares (Sievers *et al.* 2014).

2.5.4 Neuropéptidos involucrados en el metabolismo energético

Los péptidos core de AKH identificados en hemípteros no se encuentran conservados a nivel de familias: en el reduvino *R. prolixus* se identificó la secuencia pQLTFSTDW (Zandawala *et al.* 2015), mientras que en los pentatómidos *N. viridula* y *H. halys* se encontró pQLNFSPGW (Lavore *et al.* 2018) y en el cimicido *C. lectularius* se detectó la secuencia pQITFSTGW (Predel *et al.* 2018). En nuestro trabajo se halló en *T. infestans* la secuencia QLTFTPNWGamida (Figura 2.5), que presenta diferencias de longitud y secuencia respecto de su ortólogo en *R. prolixus*. Mientras que en la mayoría de las especies de insectos estos péptidos se encuentran codificados como octapéptidos, en *T. infestans* se halló como nonapéptido, al igual que en el lepidóptero *Manduca sexta* (Marco *et al.* 2013). Este resultado confirma un reporte previo sobre este gen usando la tecnología de espectrometría de masas en tándem (Marco *et al.* 2013). Estos resultados evidencian que no existe conservación de estos péptidos aún a nivel de subfamilia. Con información de secuencia de otras especies de triatomíneos podrá evaluarse si existe conservación a nivel de género.

Hormona adipokinética

RHOPR-AKH	MATNLFITSVLVLLTFHYTLAQLTFSTDW- GKRS VRHNAPDCTPNPDTVIFLYKYLQNEFYKMEICGKTGGL*
TRIIN-AKH	MATSLLATSVIVLLALHYTLAQLTFTPNWGG KRA VGNNADCTPNPETFIIFYKYLQNEFYKMMECGKTAGL*
	. *: ***.. : *****. : * ***. * . ** *****. * *****. *****. *****. ***

Figura 2.5. Alineamiento múltiple de secuencias de AKH de *T. infestans* (TRIIN) y *R. prolixus* (RHOPR), utilizada como referencia. Los sitios de clivaje por convertasas, predichos de acuerdo a los criterios propuestos por Veenstra (2000) se indican en negrita. Los residuos de glicina sombreados en gris indican una predicción de sitios de amidación. La línea punteada representa el péptido señal predicho. En la última línea de cada alineamiento el asterisco (*) indica un residuo completamente conservado, los dos puntos (:) indican sustituciones conservadas con propiedades muy similares y el punto (.) indica una sustitución semiconservada con propiedades poco similares (Sievers *et al.* 2014).

2.5.5 Alatostatinas

En los transcriptomas de las especies *Triatoma* spp. estudiados hemos encontrado los marcos de lectura completos de AST-CC. Además, en *T. infestans* se halló el marco de lectura completo de AST-CCC y un transcripto parcial de MIP (Figura 2.6). Es interesante destacar que se halló un transcripto de MIP en el transcriptoma de glándulas salivales de *T. infestans* depositado en VectorBase (www.vectorbase.org). En concordancia, la expresión del receptor de este neuropéptido fue reportada en glándulas salivales de *R. prolixus* (Lange

et al. 2012; Paluzzi *et al.* 2015). Además, se ha visto que las innervaciones de este tejido son inmunoreactivas a anticuerpos anti-MIP en dicha especie (Lange *et al.* 2012). Todo ello podría sugerir un rol de este neuropéptido en la producción/excreción de saliva.

Alatostatina CC

RHOPR-AST-CC KGGRIYWRCYFNAVTCF*
TRIDI-AST-CC KGGRIYWRCYFNAVTCF*
TRIIN-AST-CC KGGRIYWRCYFNAVTCF*
TRIPA-AST-CC KGGRIYWRCYFNAVTCF*

MIP

Alatostatina CCC

Figura 2.6. Alineamiento múltiple de secuencias de alostatinas de *T. infestans* (TRIIN), *T. dimidiata* (TRIDI) y *T. pallidipennis* (TRIPA). Las secuencias de *R. prolixus* (RHOPR) fueron utilizadas como referencia. Los sitios de clivaje por convertasas, predichos de acuerdo a los criterios propuestos por Veenstra (2000) se indican en negrita. Los residuos de glicina sombreados en gris indican una predicción de sitios de amidación. La línea punteada representa el péptido señal predicho. El doble subrayado indica los péptidos encontrados por LC-MS/MS en Traverso *et al.* (2016). En la última línea de cada alineamiento el asterisco (*) indica un residuo completamente conservado, los dos puntos (:) indican sustituciones conservadas con propiedades muy similares y el punto (.) indica una sustitución semiconservada con propiedades poco similares (Sievers *et al.* 2014). El círculo negro a la derecha del nombre de cada precursor indica que fue reconstruido a partir de varios *ESTs*.

2.5.6 Proctolinas

Hemos detectado ortólogos de este precursor en los transcriptomas de *T. dimidiata* y *T. pallidipennis* (Figura 2.7). En el caso de *T. pallidipennis* se halló una secuencia parcial que indica que existe ortología con la región C-terminal del precursor de *R. prolixus*, aunque en el caso de *Tridi-PRL* fue hallado un marco de lectura completo que codifica para un precursor más corto que el identificado en *R. prolixus*.

Proctolina

RHOPR-PRL	MATTTQSKVMSREVIIVVAVLMMVLLSSSMVQSRYLPTRGADDRILRLRQLLKDLMDLDPIMEHPAAPNGQYDPRLYKRAAPPVQWDAVGAQFAGN*
TRIDI-PRL	MIRIHFHLFKGMSREMIIVSVLMMMLLSSSMVQSRYSRSGADDRILRLRQLLKDVSTF*
TRIPA-PRL●	QSRYLPTRGADDRILRLRQLLKDV
	PALSA-QYDPRLYKRAAPPVQWDAVGAQFTGN*

Figura 2.7. Alineamiento múltiple de secuencias de proctolina de *T. infestans* (TRIIN), *T. dimidiata* (TRIDI) y *T. pallidipennis* (TRIPA). Las secuencias de *R. prolixus* (RHOPR) fueron utilizadas como referencia. Los sitios de clivaje por convertasas, predichos de acuerdo a los criterios propuestos por Veenstra (2000) se indican en negrita. En la última línea de cada alineamiento el asterisco (*) indica un residuo completamente conservado, los dos puntos (:) indican sustituciones conservadas con propiedades muy similares y el punto (.) indica una sustitución semiconservada con propiedades poco similares (Sievers *et al.* 2014). El círculo negro a la derecha del nombre de cada precursor indica que fue reconstruido a partir de varios ESTs.

2.5.7 Neuropéptidos con función desconocida

Se encontró el precursor de los neuropéptidos NPLP1 e ITG-like en las tres *Triatoma* spp. estudiadas en este trabajo. El neuropéptido NVP-like se halló en *T. infestans* y *T. dimidiata*. Si bien precursor de RYa había sido detectado en el genoma de *R. prolixus* (Ons 2017), la evidencia de su expresión en triatominos, representada por un transcripto de *T. dimidiata*, se reporta por primera vez en este trabajo. El péptido maduro más conservado de RYa en insectos se caracteriza por el motivo FFXXXRY-amida en su extremo C-terminal (Hauser *et al.* 2010; Caers *et al.* 2015; Christie 2015). Los pentatómidos *N. viridula* y *H. halys* también codifican para un péptido FYXXXRY-amida (Lavore *et al.* 2018). En esta tesis doctoral se demuestra que el precursor de *T. dimidiata*, al igual que en *R. prolixus*, codifica para un péptido de secuencia FYAAGGRYa (Figura 2.8), característica única entre los péptidos reportados hasta hoy en insectos. Con la información de secuencia de otras especies de triatominos se podrá dilucidar si se trata de una característica exclusiva de esta subfamilia.

2.5.8 Neuropéptidos no detectados en triatominos

Los precursores de inotocina, NPLP2-4, péptido sexual, trisina y hormona protoracicotrópica, que hasta la fecha no han sido detectados en el genoma de *R. prolixus*, no fueron detectado en los transcriptomas de *Triatoma* spp. analizados. Esto sugiere que estos neuropéptidos se encuentran ausentes en triatominos.

2.6 Conclusiones

- Existe una alta conservación estructural en la mayoría de los neuropéptidos comparados en *R. prolixus* y las especies del género *Triatoma*.
- Se ha observado un conjunto de neuropéptidos con características conservadas en hemípteros (SNPF) y triatominos (MS y RYamida), evidenciando divergencias evolutivas a nivel de orden y subfamilia.
- Se hallaron neuropéptidos con características diferentes dentro de la subfamilia Triatominae, como es el caso de ETH y AKH.

Capítulo 3:

Análisis transcriptómico de la intoxicación con deltametrina en *T. infestans*

3.1 Introducción

3.1.1 *Análisis cuantitativo de transcriptomas*

La secuenciación en masa del conjunto de transcriptos generados en un organismo o tejido (transcriptoma) se conoce como *RNA-seq* y constituye una herramienta útil para la identificación de los elementos funcionales de un genoma y para la realización de análisis cualitativos y cuantitativos. Permite estudiar la regulación de la expresión génica (Nagalakshmi *et al.* 2008), la estructura de los genes (Sultan *et al.* 2008), y los patrones de expresión en diferentes tejidos y/o condiciones (Alizadeh *et al.* 2000; Mortazavi *et al.* 2008). Las tecnologías de secuenciación de nueva generación poseen una serie de ventajas con respecto a otros métodos de estudio de la expresión de genes, como por ejemplo los *microarrays* (Mantione *et al.* 2014). Una de las principales es que no se necesita conocer con anterioridad la secuencia de los genes a estudiar, lo que las convierten en herramientas valiosas para el estudio de organismos no modelo.

Illumina HiSeq lidera actualmente la lista de plataformas de secuenciación para estudios de *RNA-seq*, debido a su alta capacidad de procesamiento, profundidad y baja tasa de error a un costo bajo por base (Anamika *et al.* 2016; van Dijk *et al.* 2014). La tecnología Illumina se basa en tres pasos importantes (Illumina 2017) (Figura 3.1):

- Preparación de las bibliotecas: la muestra de ARN total es tratada para eliminar el ARN ribosomal y convertida a ADNc, el cual se fragmenta aleatoriamente. A cada fragmento se le ligan adaptadores de secuenciación (Figura 3.1 A).
- Generación de *clusters*: la biblioteca es cargada en una celda de flujo donde los fragmentos son capturados por los oligonucleótidos complementarios a los adaptadores que se encuentran adheridos a la superficie de la celda. A continuación, cada fragmento es amplificado en un *cluster* diferente (Figura 3.1 B).
- Secuenciación: la enzima ADN polimerasa cataliza la incorporación de dNTPs fluorescentes, utilizando una hebra de ADN molde. Luego de cada incorporación, los fluoróforos son excitados con láser para su identificación. Este proceso se realiza con millones de fragmentos en simultáneo (Figura 3.1 C).

Otro avance importante de las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento es la secuenciación de lecturas *paired-end* (Figura 3.1 D). Esta metodología consiste en secuenciar ambos extremos del fragmento de ADN de la biblioteca. Además de producir

lecturas *forward* y lecturas *reverse* (lo que resulta en el doble de lecturas en el mismo lapso de tiempo), las secuencias alineadas como pares permiten una mayor precisión en los pasos posteriores de ensamblado y mapeo, en comparación con las bibliotecas *single-end*.

Dadas las ventajas expuestas y la ausencia de secuencia genómica para *T. infestans*, en este trabajo se decidió utilizar una secuenciación *paired-end* de 150 pares de bases. Esto permitió alcanzar la cobertura necesaria para lograr un correcto ensamblado y por lo tanto un transcriptoma representativo.

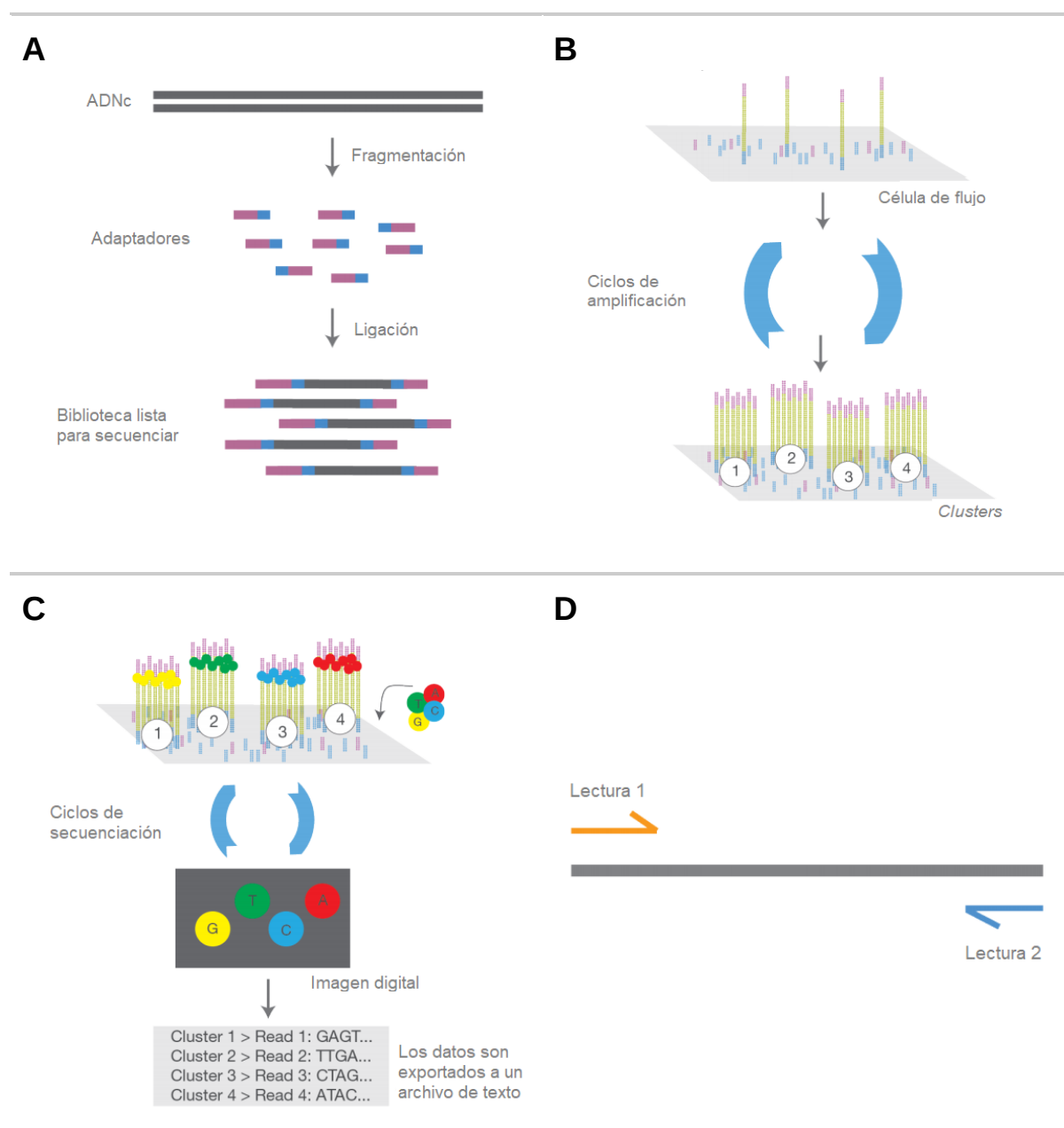


Figura 3.1. Pasos de la reacción de secuenciación utilizada por la tecnología Illumina. A) Preparación de bibliotecas. **B)** Generación de *clusters*. **C)** Secuenciación. **D)** Esquematización de

lecturas *paired-end*, donde ambos extremos de cada fragmento de ADNc son secuenciados. Figuras extraídas y modificadas de Illumina 2017.

Una vez obtenidas las secuencias crudas, el análisis bioinformático comienza con el tamizado de las lecturas para eliminar bases de baja calidad y restos de adaptadores de secuenciación. Posteriormente, se procede al ensamblado para reconstruir todos los transcriptos presentes en las muestras. En ausencia de una secuencia genómica anotada, el ensamblado debe realizarse *de novo*. La mayoría de los enfoques de este tipo utilizan el algoritmo basado en gráficos de *de Bruijn*. Este gráfico matemático se basa en una cadena de letras (en este caso nucleótidos) de longitud k para representar nodos. Estos nodos se conectan si al desplazarse por la cadena en un nucleótido se genera una superposición exacta $k-1$ entre los nodos (Pevzner *et al.* 2001). Existen muchos programas que utilizan este algoritmo para el ensamblado de transcriptomas. Entre ellos, Trinity (Haas *et al.* 2013) utiliza tres programas para producir el ensamblado: *Inchworm* construye un conjunto inicial de *contigs* a partir de gráficos de *k-mers*; *Chrysalis* agrupa esos *contigs* y genera los gráficos de De bruijn a partir de ellos; y *Butterfly* resuelve los gráficos para generar el conjunto final de transcriptos, que contiene variantes de *splicing* e isoformas.

Además de conocer la secuencia de los genes expresados en un organismo, la tecnología de *RNA-Seq* permite comparar de manera cuantitativa los niveles de expresión de genes en diferentes tejidos y/o condiciones, con el fin de extraer conclusiones relevantes (Wang *et al.* 2009). El primer paso para el estudio de la expresión génica es el “mapeo”, que tradicionalmente consiste en alinear las lecturas generadas con una secuencia de referencia (genoma o transcriptoma) para estimar la abundancia de cada transcripto en una muestra. Dado que esta metodología requiere de alta capacidad de procesamiento computacional, recientemente se han desarrollado herramientas alternativas que utilizan el algoritmo de *quasi-alignments*, basados en la información contenida en *k-mers* para determinar si una secuencia es compatible con un fragmento. Uno de los programas que utiliza esta metodología de mapeo es Salmon (Patro *et al.* 2017), que debido a la rapidez en el procesamiento de las muestras constituye una herramienta más accesible.

Una vez obtenida la información de mapeo, ésta se cuantifica a nivel de gen o transcripto (número de lecturas que alinean por cada uno), y esas cuantificaciones se normalizan según la estadística apropiada para evaluar la expresión diferencial de los genes. Finalmente, las listas de genes diferencialmente expresados son analizadas a fin de interpretar los procesos biológicos subyacentes (Oshlack *et al.* 2010).

3.1.2 RNA-seq como método de estudio de la respuesta a la intoxicación con insecticidas

Si bien existen numerosos estudios transcriptómicos de diferentes especies de insectos de interés económico y sanitario (ver Introducción General) existen pocos estudios que indaguen sobre la respuesta transcriptómica global de estos organismos a los insecticidas utilizando *RNA-seq* (Aufauvre *et al.* 2014; David *et al.* 2010; Reid *et al.* 2018; Wu *et al.* 2017; Yang *et al.* 2016; Zhou *et al.* 2018). En este sentido, es muy poco lo que se conoce respecto de la respuesta transcriptómica global de insectos causada por la intoxicación con piretroides, y ninguno de ellos ha abordado el estudio de estos fenómenos en triatominos.

En este capítulo se describe el ensamblado del transcriptoma de *T. infestans* y su utilización para estudiar la expresión diferencial de genes en respuesta al insecticida piretroide deltametrina. Si bien existen poblaciones de *T. infestans* con niveles de resistencia muy altos (revisado en Mougabure-Cueto & Picollo 2015), sabemos hoy que estos niveles extremos se deben a mutaciones puntuales en el canal de sodio dependiente de voltaje (Fabro *et al.* 2012; Capriotti *et al.* 2014; Sierra *et al.* 2016). Por lo tanto, hipotetizamos que un análisis de este tipo en una población de alta resistencia enmascararía una respuesta transcriptómica detoxificativa. Debido a esto se eligió para este trabajo una población proveniente de Colonia Castelli (Provincia de Chaco, Argentina) que posee un nivel de resistencia considerado bajo (tasa de resistencia = 3,06). Al tratarse de una población del campo posee una historia de rociado previo con piretroides y el grado de resistencia observado puede deberse a la optimización de mecanismos fisiológicos de respuesta a tóxicos en comparación con poblaciones sensibles. Por lo tanto, una población con estas características resulta sumamente interesante para estudiar su respuesta detoxificativa.

Por otra parte, hemos elegido el tiempo post-topicación de 4 horas para poder detectar los efectos agudos producidos por la intoxicación. Estudios a tiempos más prolongados podrían ser interesantes a futuro para completar el panorama transcriptómico de intoxicación por piretroides, y podrían revelar vías involucradas a largo plazo. El análisis transcriptómico presentado en este trabajo de Tesis Doctoral constituye el primer estudio cuantitativo de la expresión génica global modulada por un insecticida en un vector de la enfermedad de Chagas.

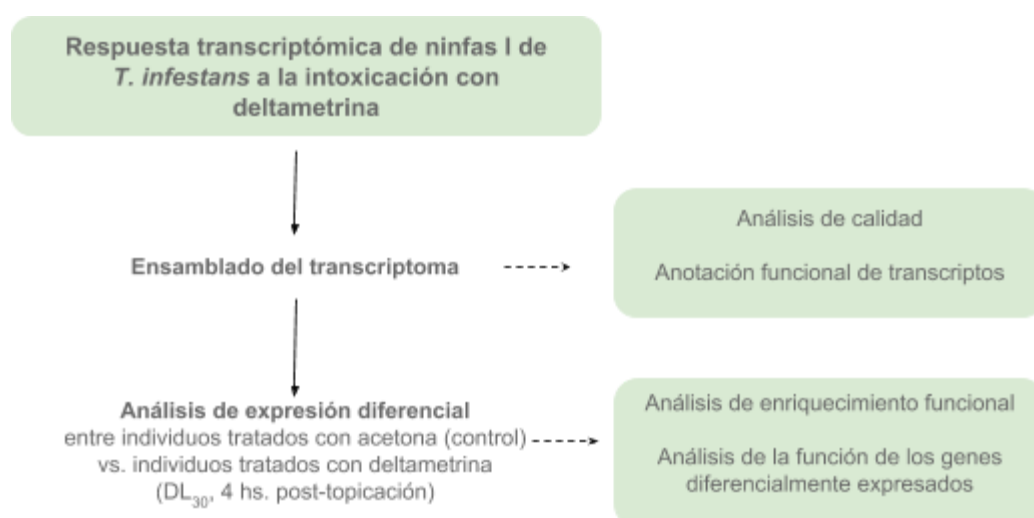
3.2 Hipótesis

El tratamiento de *T. infestans* con deltametrina produce cambios en los niveles de expresión génica que pueden ser cuantificados con la técnica de *RNA-seq*, lo cual es un aporte hacia el conocimiento de los mecanismos detoxificativos activados.

3.3 Objetivos específicos

- Ensamblar y anotar el transcriptoma completo de ninfa de primer estadio de *T. infestans*.
- Estudiar los cambios transcriptómicos que se producen luego de 4 horas de ocurrida la intoxicación con deltametrina en individuos provenientes de una población de *T. infestans* de resistencia baja a piretroides.

3.4 Resumen de la metodología utilizada



3.5 Resultados y discusión

3.5.1 *Secuenciación y ensamblado*

Como resultado de la secuenciación de 8 bibliotecas de ADNc generado a partir de ARN de *T. infestans*, se obtuvieron un total de 185.786.244 lecturas *paired-end*. El análisis mediante el programa FASTQC (Andrews 2010) reveló una buena calidad de secuenciamiento (Anexo I, Tablas suplementarias S3.1 y S3.2). Si bien se observaron fallas en el parámetro que analiza la proporción de secuencias duplicadas de secuencias, esto es esperable dado que se trata de muestras que no están normalizadas. La normalización reduce la variación en el nivel de expresión de los genes (Vogel & Wheat 2011), por lo que en muestras no normalizadas, aquellos genes que están más expresados pueden tener varias lecturas que pueden ser detectadas como duplicadas. Los parámetros de “Contenido de secuencia por base” y “Contenido de GC por base” indican que es posible que existan adaptadores que generan un sesgo en la región de la secuencia en que se encuentran. Para eliminarlos, se utilizó el programa Trimmomatic (Bolger *et al.* 2014) a fin de obtener únicamente las lecturas altamente confiables, que permitan un ensamblado de alta calidad que garantice la confiabilidad de los análisis posteriores. Se eliminaron menos del 16,1% de las lecturas de cada muestra, por no alcanzar los parámetros de calidad establecidos (Figura 3.2). La mejora en los parámetros de calidad obtenidos para las muestras antes y después del procesamiento por Trimmomatic se ejemplifica con la muestra 1 en las Figuras 3.3 A y B.

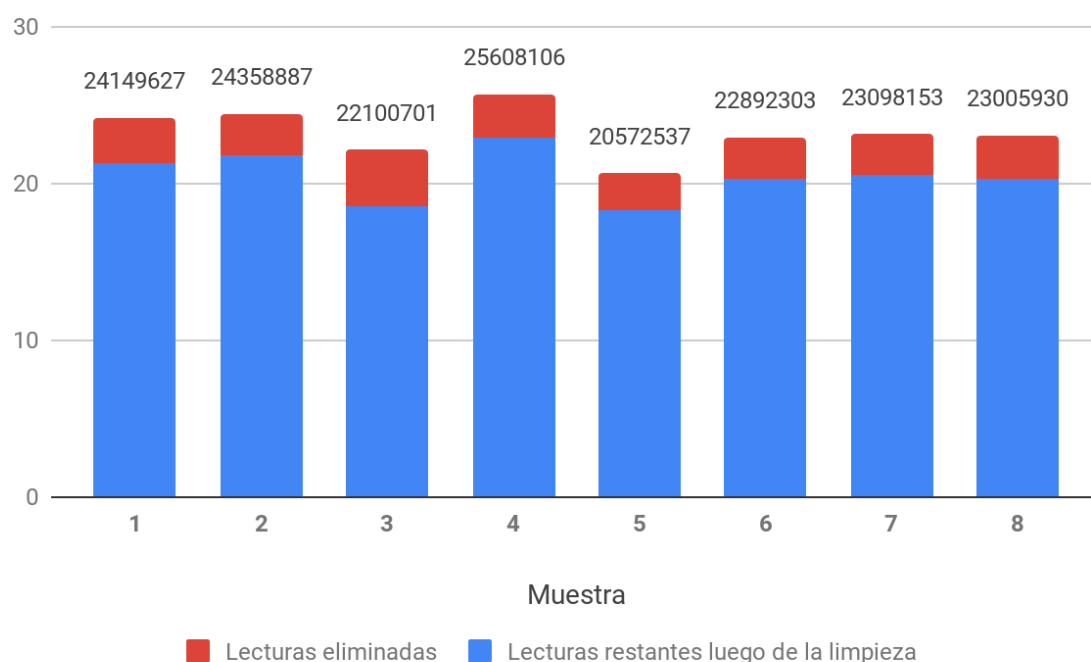


Figura 3.2. Cantidad de lecturas eliminadas y resultantes por muestra luego de la limpieza de los datos. Sobre cada barra se muestra la cantidad total de lecturas por muestra. La eliminación varió entre un 10,4% (Muestra 5) y un 16,1% (Muestra 3).

Los parámetros “Contenido de secuencia por base” y “Contenido de GC por base” no mejoraron luego de la limpieza de las lecturas. Es probable que esto se deba al sesgo generado en las primeras bases por la metodología Illumina, que utiliza *random primers* para la preparación de las muestras (Hansen *et al.* 2010). El corte de estas primeras 12 bases de las lecturas no mejoró los parámetros subsiguientes del análisis con respecto a las bibliotecas que no poseen el corte de este primer fragmento (datos no mostrados), por lo que se prosiguió con las lecturas no recortadas.

Las lecturas de alta calidad obtenidas para cada muestra se utilizaron para realizar el ensamblado *de novo* del transcriptoma mediante el programa Trinity (Haas *et al.* 2013). Este programa agrupa los transcritos ensamblados en *clusters* basándose en el contenido de las secuencias que son comunes a esos transcritos. Estos *clusters* de transcritos son denominados ‘genes’, sin referirse a ese término en el sentido estricto de la palabra. En adelante en este trabajo nos referiremos a ‘genes’ respecto de los *clusters* de transcritos que comparten cierto nivel de homología.

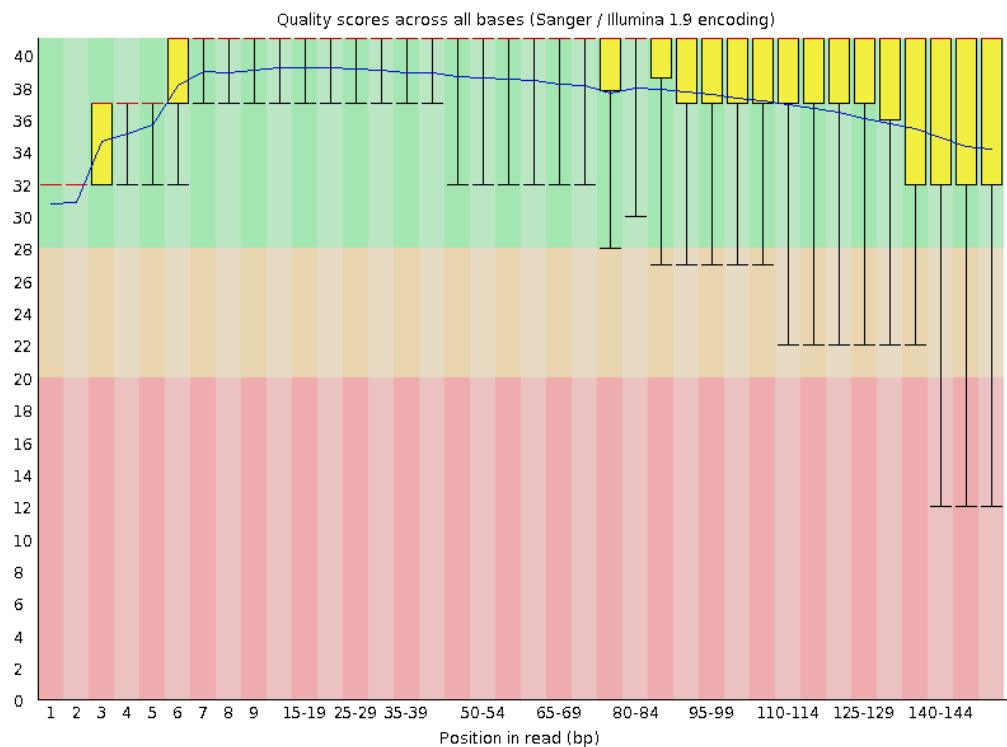
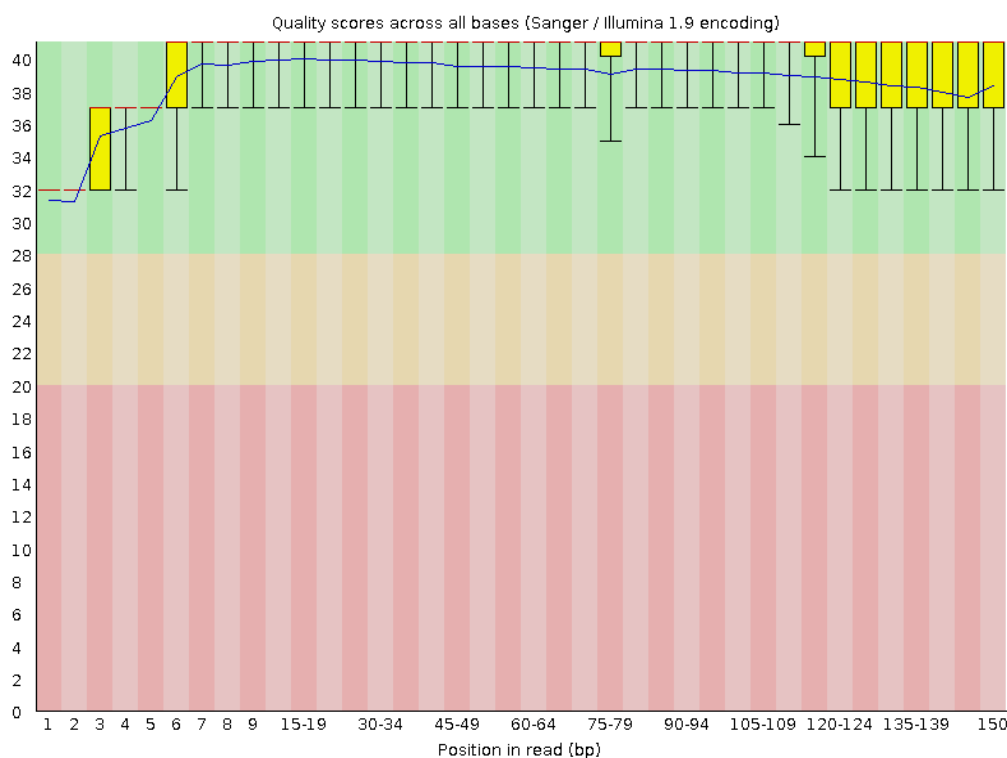
A**B**

Figura 3.3. Gráfico de calidad por base vs. longitud de cada lectura de la muestra 1 reverse.

Se muestra el resultado de la evaluación de calidad anterior **(A)** y posterior **(B)** a la limpieza con el programa Trimmomatic.

El resultado del ensamblado resultó en un total de 383.851 transcritos reconstruidos, pertenecientes a 269.388 'genes'. En la Tabla 3.1 se muestran las estadísticas básicas del transcriptoma ensamblado. Teniendo en cuenta todos los *contigs* generados en este ensamblado, el 50% de las bases están contenidas en transcritos de al menos 968 pb de longitud.

Estadísticas generales	
Total de 'genes'	269.388
Total de transcritos	383.851
Porcentaje de GC	34,31%
Estadísticas basadas en todos los <i>contigs</i> ensamblados	
<i>Contig</i> N10	3.928
<i>Contig</i> N20	2.689
<i>Contig</i> N30	1.916
<i>Contig</i> N40	1.368
<i>Contig</i> N50	968
Mediana de la longitud de los <i>contigs</i>	385
Promedio de la longitud de los <i>contigs</i>	668,4
Total de bases ensambladas	256.567.686
Estadísticas basadas en la isoforma más larga por gen	
<i>Contig</i> N10	3.020
<i>Contig</i> N20	1.837
<i>Contig</i> N30	1.197
<i>Contig</i> N40	848
<i>Contig</i> N50	635
Mediana de la longitud de los <i>contigs</i>	350
Promedio de la longitud de los <i>contigs</i>	539,19
Total de bases ensambladas	145.252.635

Tabla 3.1. Estadísticas del ensamblado *de novo*. El valor de Nx indica que al menos el x% de todas las bases ensambladas están contenidas en transcritos de al menos ese valor de longitud.

Con el fin de realizar un análisis cuantitativo de la representatividad del transcriptoma resultante, se realizó un análisis mediante el programa *Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs* (BUSCO) (Simão *et al.* 2015; Waterhouse *et al.* 2017). Este programa reporta la representación en el ensamblado de genes ortólogos comunes para diferentes linajes, seleccionados de OrthoDB (www.orthodb.org). En nuestro caso, se utilizó la base de datos de la clase Insecta y el análisis arrojó un total de 97% de ortólogos completos (Figura 3.4).

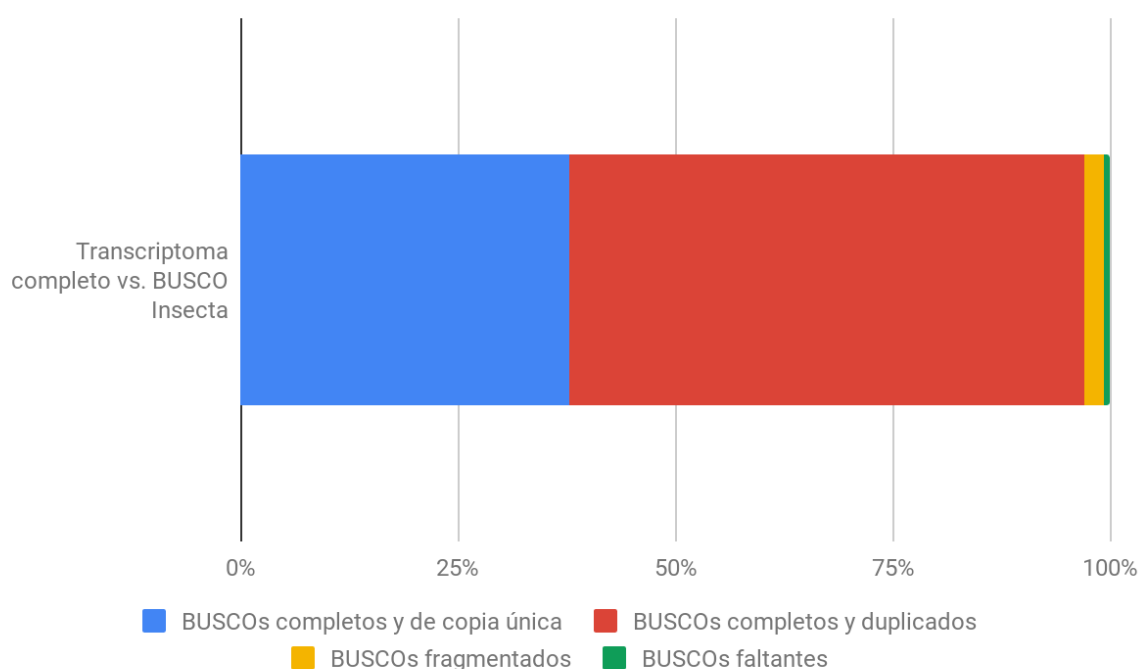
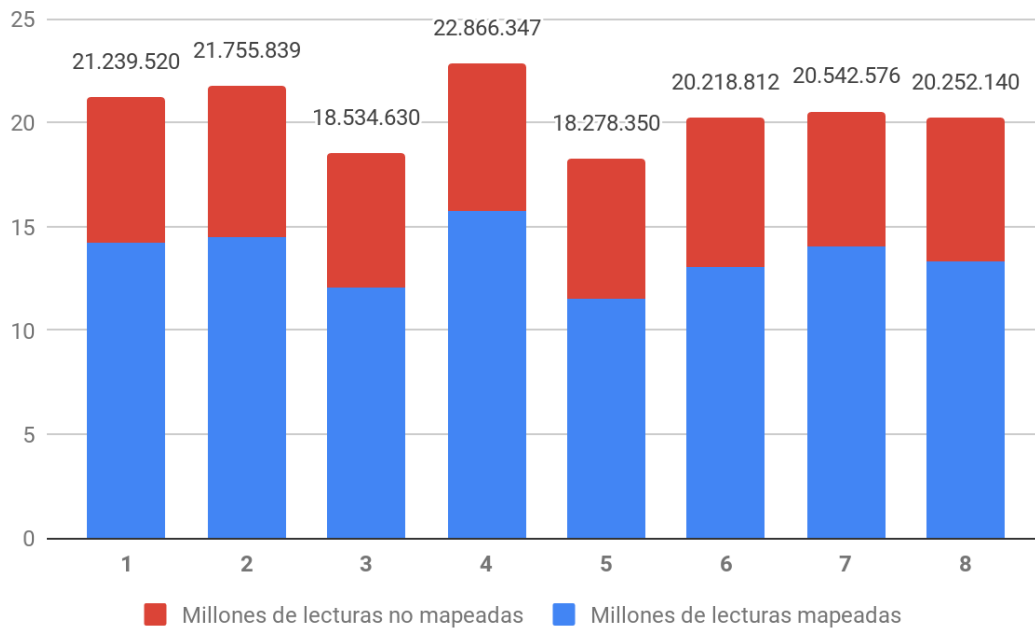


Figura 3.4. Resultado de la evaluación de la calidad del transcriptoma mediante el programa BUSCO.

El porcentaje de lecturas mapeadas al transcriptoma ensamblado es un buen indicador adicional de la calidad. Por consiguiente, se realizó el mapeo de las lecturas de cada muestra al ensamblado generado mediante el programa Salmon versión 0.11.1 (Patro *et al.* 2017) (Figura 3.5). En todas las muestras el porcentaje de mapeo de lecturas fue mayor al 60%. Esto representa más de 11,5 millones de lecturas en todos los casos, llegando a 15,7 millones de lecturas mapeadas en la muestra más abundante. Es posible que las lecturas que no mapean al transcriptoma ensamblado provengan de transcritos que no pudieron ser reconstruidos correctamente debido a su bajo nivel de expresión.

A



B

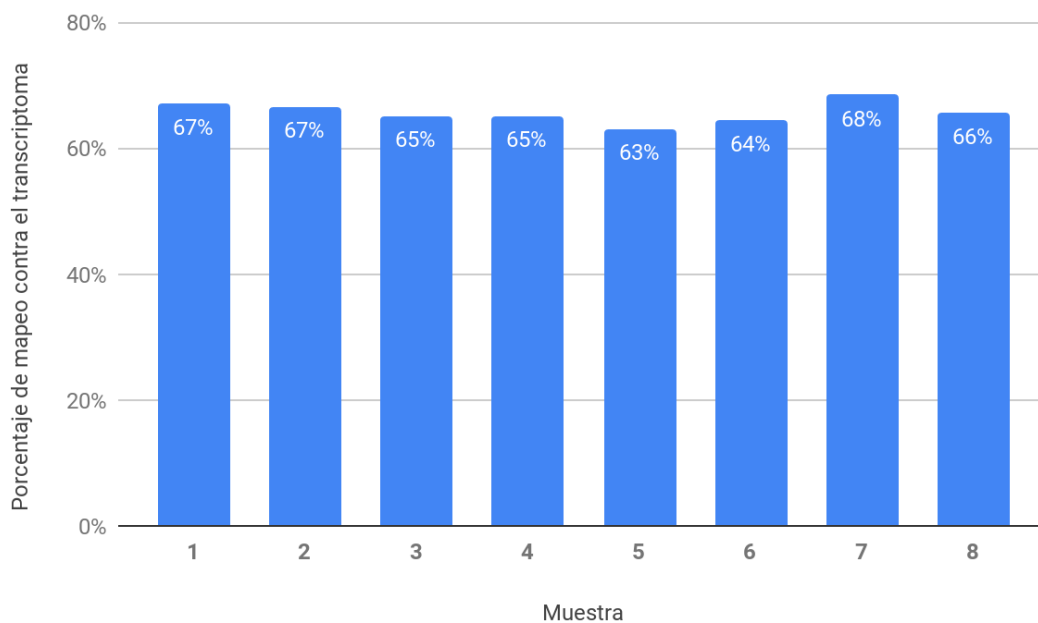


Figura 3.5. Mapeo de cada muestra al transcriptoma ensamblado mediante el programa Salmon. A) Millones de lecturas mapeadas y no mapeadas por muestra al transcriptoma ensamblado. Encima de cada barra se muestra la cantidad total de lecturas. **B)** Porcentaje de mapeo de cada muestra al transcriptoma ensamblado.

Con la información de mapeo y a través del *script* de cuantificación de transcritos del programa Trinity (ver Materiales y métodos) se obtuvo una matriz de valores *transcripts per million* (TPM). Estos valores de mapeo están normalizados respecto de la longitud de cada transcripto, el número de lecturas que mapean a cada uno y el número total de lecturas mapeadas a todos ellos. En esta matriz todos los valores sumarán un millón para cada cada muestra. Para considerar un transcripto como expresado, al menos un par de lecturas *paired-end* deben mapear al mismo. Dado que estamos trabajando con un ensamblado *de novo*, puede ocurrir que ese mapeo de ambas lecturas no tenga lugar si el transcripto está incompleto, porque debido a su bajo nivel de expresión no pudo ser reconstruido correctamente. Si se evalúa la cantidad de transcritos en función de los valores de TPM (con la ayuda del *script* *count_matrix_features_given_MIN_TPM_threshold.pl* del programa Trinity), se desprende que hay 172.645 transcritos que están expresados en al menos 1 TPM en alguna de las muestras, es decir, que la sensibilidad del ensamble hizo posible la reconstrucción de esa cantidad de transcritos con la evidencia de estar expresados en dicho umbral. Al graficar la cantidad de transcritos en función de sus valores de TPM (tomando el intervalo de 0 a 100), puede visualizarse que la mayoría de los transcritos expresados poseen un nivel de expresión mínimo, y unos pocos se encuentran muy expresados (Figura 3.6).

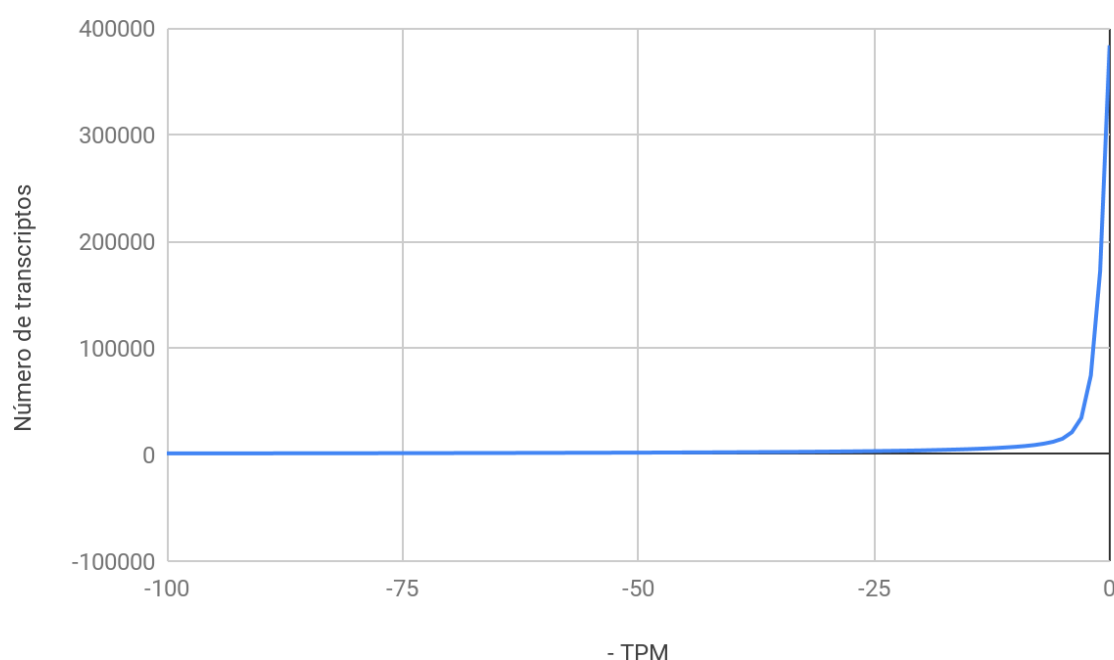


Figura 3.6. Número de transcritos vs. valores de TPM (expresados como valores negativos).

Con estos datos disponibles es posible calcular el valor de ExN50, que calcula los valores de N50 tal como en el punto 3.5.1, pero restringido a los transcritos más expresados que representan cierto porcentaje del total de la expresión normalizada. En nuestro caso, el valor de N50 basado en todos los *contigs* ensamblados es 968 pares de bases (Tabla 3.1). Si se excluye la gran cantidad de transcritos que están poco expresados, los valores de N50 aumentan. Esto se explica por el hecho de que es probable que su bajo nivel de expresión no permitió que estos transcritos fueran reconstruidos de manera completa. La longitud más larga se alcanza cerca del valor de Ex90 (Figura 3.7). El Ex89N50 en este ensamble se calcula a partir de 20.692 transcritos y es de 2047 pares de bases (Figura 3.7), valor que supera el doble de longitud que la obtenida al calcular el N50 a partir de todos los transcritos. El valor de ExN50 representa el valor de N50 de una manera más fehaciente, ya que en éste último no se incluyen aquellos transcritos con errores de ensamblado.

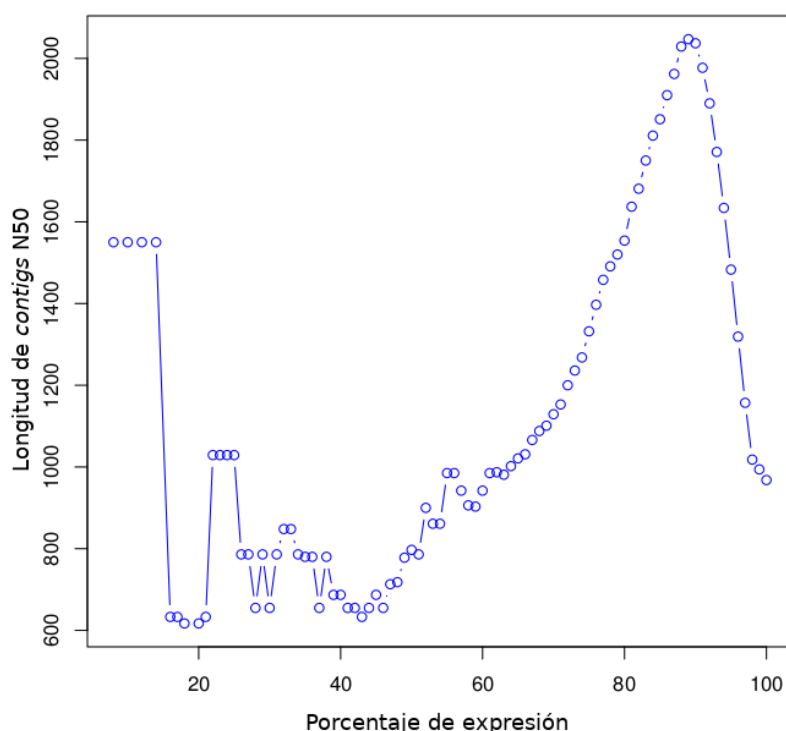


Figura 3.7 Gráfico de longitud de *contigs* N50 vs. el porcentaje de expresión normalizada total.

3.5.2 Anotación funcional del transcriptoma generado

El proceso de anotación consiste en asignar una identidad a los transcritos del ensamble generado, con el fin de obtener información sobre su función. El paso inicial para la anotación es la identificación de las coordenadas en la que se encuentra codificada la secuencia proteica de interés dentro de los transcritos. Este paso se realizó con el programa Transdecoder versión 5.3.0 (<https://transdecoder.github.io/>), que identifica los posibles marcos abiertos de lectura contenidos en los transcritos. El paso de *Transdecoder.LongOrfs* se utilizó para descartar aquellos marcos de lectura con una longitud menor a 50 aminoácidos, con lo que se obtuvieron 469.793 posibles marcos de lectura. Posteriormente, en el paso de *Transdecoder.Predict* se eliminaron los marcos de lectura con baja probabilidad de ser codificantes, a excepción de aquellos con homología con la base de datos de Uniprot (*reviewed-SwissProt*, The UniProt Consortium 2018) analizada mediante una búsqueda por BLAST (Altschul *et al.* 1990) y con la base de datos Pfam-A (Finn *et al.* 2016) analizada mediante el programa HMMER (hmmer.org/). Como resultado se retuvieron un total de 150.037 proteínas predichas con una longitud media de 146,11 aminoácidos y más del 40% de ellas se clasificaron como completas.

Una vez obtenida la información de las secuencias proteicas contenidas en el transcriptoma, fue posible realizar búsquedas adicionales que permitieron completar el proceso de anotación funcional de las secuencias. Con este fin, se utilizó el programa Trinotate (<https://trinotate.github.io/>) para realizar una anotación completa de cada secuencia del transcriptoma y de las proteínas predichas previamente con Transdecoder. Para la identificación de dominios proteicos, se utilizó el programa HMMER (hmmer.org) y la base de datos Pfam-A (Finn *et al.* 2016). En paralelo, se evaluó la homología de las proteínas predichas por Transdecoder mediante *blastp* y de las secuencias nucleotídicas del transcriptoma ensamblado mediante *blastx* utilizando tres bases de datos de secuencias proteicas diferentes. Por un lado, se utilizó la base de datos *reviewed-SwissProt* obtenida de Uniprot (The UniProt Consortium 2018), que contiene secuencias de proteínas no redundantes y anotadas manualmente de más de diez mil organismos pertenecientes a eucariotas, bacterias, virus y arqueas. Por otro lado, y con el fin de obtener una identificación más precisa a partir de organismos más relacionados evolutivamente, se utilizaron las secuencias de proteínas de la mosca de la fruta *D. melanogaster*

(*dmel-all-translation-r6.24*, obtenidas de FlyBase) y las secuencias de proteínas del triatomino *R. prolixus* (*CDC_PEPTIDES_RproC3.3*, obtenidas de VectorBase). En la Tabla 3.2 se resume la cantidad de anotaciones obtenidas por base de datos.

<i>Uniprot</i>		<i>D. melanogaster</i>		<i>R. prolixus</i>	
<i>blastx</i>	<i>blastp</i>	<i>blastx</i>	<i>blastp</i>	<i>blastx</i>	<i>blastp</i>
50.060	46.344	39.826	37.773	76.580	57.332

Tabla 3.2. Cantidad de transcritos anotados por base de datos mediante *blastx* y *blastp* (Altschul *et al.* 1990). Los resultados fueron recopilados en la tabla de salida del programa Trinotate.

Una vez realizada la anotación de las proteínas presentes en el transcriptoma, se utilizó esta información para incorporar anotaciones funcionales. Actualmente existen diversas bases de datos que permiten asociar las proteínas con su función. Algunas de ellas son:

- *Gene Ontology* (GO): un sistema de clasificación que describe la función de los genes de acuerdo a tres categorías: función molecular (acción desarrollada a nivel molecular por el producto de un gen), proceso biológico (vías y procesos compuestos por las actividades de múltiples productos génicos) y componente celular (las ubicaciones relativas a las estructuras celulares en las que un producto de un gen desarrolla una función) (Ashburner *et al.* 2000; The Gene Ontology Consortium 2017).

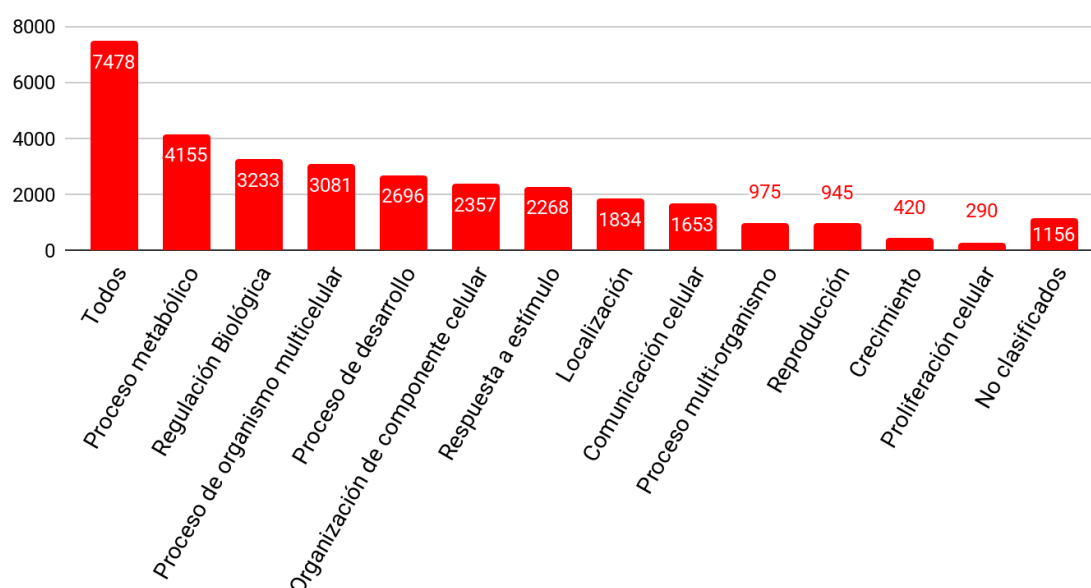
- *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG): una base de datos útil para la comprensión de funciones y utilidades de un sistema biológico (como una célula, un organismo y/o un ecosistema), a partir de información a nivel molecular. Es especialmente útil para el estudio de conjuntos de datos moleculares a gran escala (<https://www.genome.jp/kegg/>).

- *Evolutionary genealogy of genes: Non-supervised Orthologous Groups* (EggNOG): base de datos de grupos ortólogos (OG) de proteínas a diferentes niveles taxonómicos, cada uno con anotaciones funcionales integradas y resumidas.

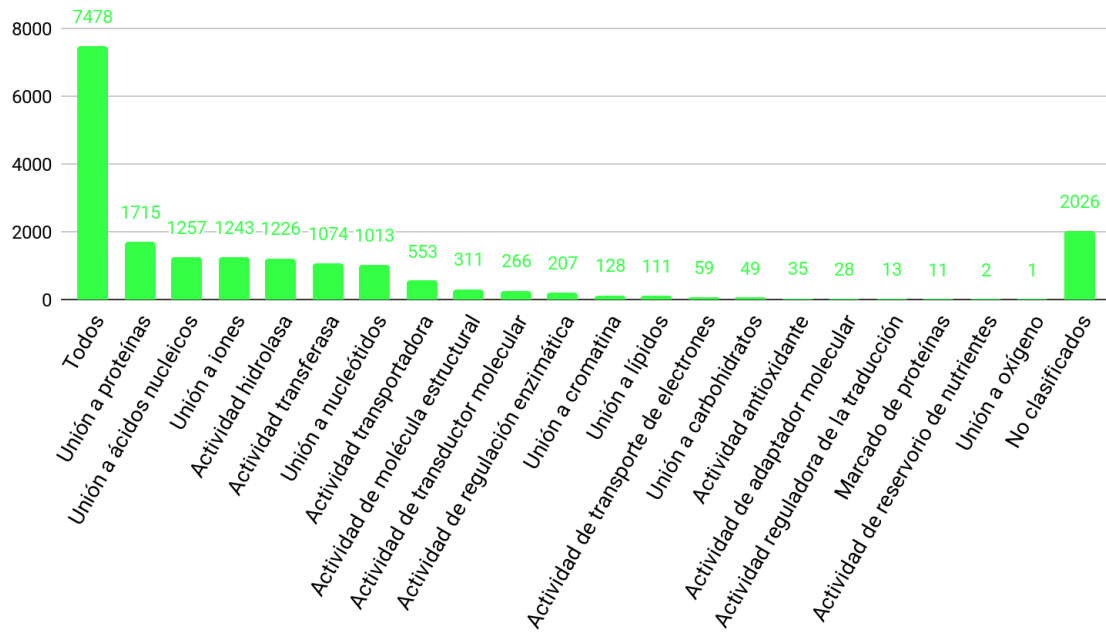
Mediante el programa Trinotate se obtuvo una tabla que muestra para cada secuencia del transcriptoma la principal coincidencia obtenida mediante las búsquedas BLAST en las bases de datos estudiadas, la anotación de dominios PFAM y la proteína predicha por Transdecoder, los términos GO asociados (obtenidos a partir de los resultados de *blastp* y PFAM), y los términos asociados de EggNOG y KEGG (obtenidos a partir de los resultados de *blastp* contra la base de datos de Uniprot) (Anexo I, Archivo suplementario SE1).

Con el fin de obtener un resumen de las anotaciones GO se utilizó la información de secuencias homólogas de los transcritos de *T. infestans* con la especie *D. melanogaster*. Se eligió la homología con esta especie dado que es un organismo modelo que posee la anotación más completa y curada de su secuencia genómica entre las especies de insectos. Los homólogos identificados en *D. melanogaster* fueron clasificados según los términos GOslim (versión reducida que ofrece una visión general sin detalle de términos específicos) a los cuales están asociados, mediante el programa *WEB-based Gene Set Analysis Toolkit* (WebGestalt) (Wang *et al.* 2017). Como resultado, fue posible clasificar 7.478 genes únicos en las categorías de proceso biológico (Figura 3.8 A), función molecular (Figura 3.8 B) y componente celular (Figura 3.8 C). En cuanto a la categoría de proceso biológico, la mayor cantidad de anotaciones corresponde a “proceso metabólico” (GO:0008152; <http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0008152>), que incluye las reacciones químicas y las vías mediante las cuales los organismos vivos transforman las sustancias químicas. La función molecular más abundante es “unión a proteínas” (GO:0005515). Este término refiere a la interacción selectiva y no covalente con cualquier proteína o complejo de proteínas (<http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0005515>). En cuanto a componente celular, el predominante fue “membrana” (GO:0016020) (<http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0016020>) (Figura 3.8 A-C).

A



B



C

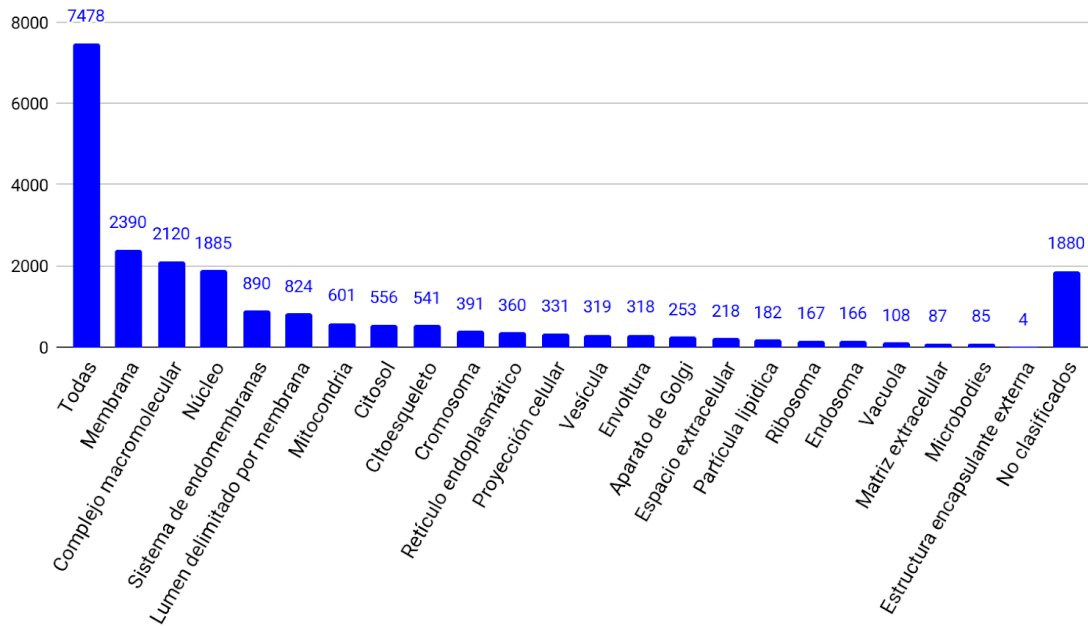


Figura 3.8. Resumen de las categorías *GOslim* para los genes analizados. Las categorías de proceso biológico (A), función molecular (B) y componente celular (C) están representadas por barras rojas, verdes y azules respectivamente. La altura de cada barra representa el número de genes observados en la categoría.

3.5.3 Caracterización de la secuencia del canal de sodio dependiente de voltaje

Con el fin de analizar la presencia de posibles polimorfismos en el sitio de acción de los insecticidas piretroides, se analizaron las secuencias reconstruidas para el canal de sodio dependiente de voltaje en el transcriptoma obtenido. Las secuencias se alinearon utilizando como referencia la secuencia completa de esta proteína de *T. infestans* (Sierra 2018) y de *Musca domestica*, ya que la nomenclatura a partir de la cual se describen las mutaciones en este canal se basa en la secuencia de esta especie (Ingles *et al.* 1996; Williamson *et al.* 1996). En las secuencias del transcriptoma de la población de Colonia Castelli utilizada en este trabajo no se hallaron las sustituciones L1014F ni L925I (Figura 3.9), previamente reportadas en poblaciones de *T. infestans* altamente resistentes a piretroides (Fabro *et al.* 2012; Capriotti *et al.* 2014; Sierra *et al.* 2016). Este resultado indicaría que la baja tasa de resistencia poblacional observada es probablemente debida a eventos de resistencia metabólica, y no a una frecuencia baja de individuos portadores de mutaciones tipo *kdr*.

Musdo-para	KSWPTLNLLISIMGRMTGALGNLTFVLCIIIFIFAVMGMQLFGKNYIDHKDRFKD	960
Triin-para	KSWPTLNLLISIMGRTVGALGNLTFVLCIIIFIFAVMGMQLFGKNYIDNVGDFPG	907
TRINITY_DN43844_c3_g1_i5	KSWPTLNLLISIMGRTVGALGNLTFVLCIIIFIFAVMGMQLFGKNYIDNVGDFPG	62
TRINITY_DN43844_c3_g1_i8	KSWPTLNLLISIMGRTVGALGNLTFVLCIIIFIFAVMGMQLFGKNYIDNVGDFPG	62
TRINITY_DN43844_c3_g1_i12	KSWPTLNLLISIMGRTVGALGNLTFVLCIIIFIFAVMGMQLFGKNYIDNVGDFPG	217
TRINITY_DN43844_c3_g1_i3	KSWPTLNLLISIMGRTVGALGNLTFVLCIIIFIFAVMGMQLFGKNYIDNVGDFPG	62
TRINITY_DN43844_c3_g1_i7	KSWPTLNLLISIMGRTVGALGNLTFVLCIIIFIFAVMGMQLFGKNYIDNVGDFPG	62
	*****:*****: . * .	
Musdo-para	HELPRWNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCMHVGDVSCIPFFLATVVIGNL	1014
Triin-para	GELPRWNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCMHVGDVSCIPFFLATVVIGNL	961
TRINITY_DN43844_c3_g1_i5	GELPRWNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCMHVGDVSCIPFFLATVVIGNL	116
TRINITY_DN43844_c3_g1_i8	GELPRWNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCMHVGDVSCIPFFLATVVIGNL	116
TRINITY_DN43844_c3_g1_i12	GELPRWNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCMHVGDVSCIPFFLATVVIGNL	271
TRINITY_DN43844_c3_g1_i3	GELPRWNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCMHVGDVSCIPFFLATVVIGNL	116
TRINITY_DN43844_c3_g1_i7	GELPRWNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCMHVGDVSCIPFFLATVVIGNL	116
	*****:*****:*****	

Figura 3.9. Alineamiento de un fragmento correspondiente al dominio II de los transcriptos del canal de sodio dependiente de voltaje (*para*). *Triin-para* representa la secuencia hallada en el transcriptoma de glándulas salivales de *T. infestans* (Schwarz 2014); *Musdo-para* corresponde a la secuencia de referencia de *M. domestica* (NP_001273814.1) y las secuencias denominadas TRINITY_DN43844 fueron obtenidas en el transcriptoma ensamblado en este trabajo. En la figura se indican con un recuadro los residuos L925 y L1014, que presentan sustituciones que confieren resistencia en algunas poblaciones de *T. infestans*. El alineamiento fue realizado con el programa Clustal Omega; en la última línea de cada alineamiento el asterisco (*) indica un residuo completamente conservado, los dos puntos (:) indican sustituciones conservadas con propiedades muy similares y el punto (.) indica una sustitución semiconservada con propiedades poco similares (Sievers *et al.* 2014).

3.5.4 *Análisis de expresión diferencial*

Con el fin de comparar estadísticamente la expresión de genes en las muestras tratadas con deltametrina respecto de las muestras control tratadas con acetona, se obtuvieron matrices de contabilización de lecturas por muestra correspondientes a cada transcripto mediante el programa Trinity (ver Materiales y métodos). Se utilizó el análisis de expresión de los transcriptos (y no de 'genes', dado que en este tipo de análisis se refiere a un grupo de transcriptos) por considerarse más informativa. En este paso se utilizó la matriz de cantidad de lecturas que mapearon a cada transcripto (sin normalización), y la matriz que contiene los valores *Trimmed Mean of M-values* (TMM), que tiene en cuenta la diferencia en la cantidad total de ARN en todas las muestras (Robinson & Oshlack 2010). Esta matriz es útil para el análisis de expresión diferencial ya que se considera que esta metodología mantiene una tasa baja de falsos positivos, al mismo tiempo que permite la detección de genes diferencialmente expresados (Dillies *et al.* 2013).

3.5.4.1 Análisis de la calidad de las réplicas

En primer lugar se exploró la relación de las réplicas de cada grupo utilizando la información contenida en la matriz de valores TMM, mediante el script *PtR* del paquete Trinity. Se grafican tres componentes principales para explicar la variación de los datos (Figura 3.10). Puede observarse que las réplicas no se agrupan según el tratamiento recibido y que además existe una mayor variación en las muestras correspondientes al tratamiento con deltametrina (Figura 3.10). Esta dispersión es esperable al tratarse de población de campo y no una cepa de laboratorio.

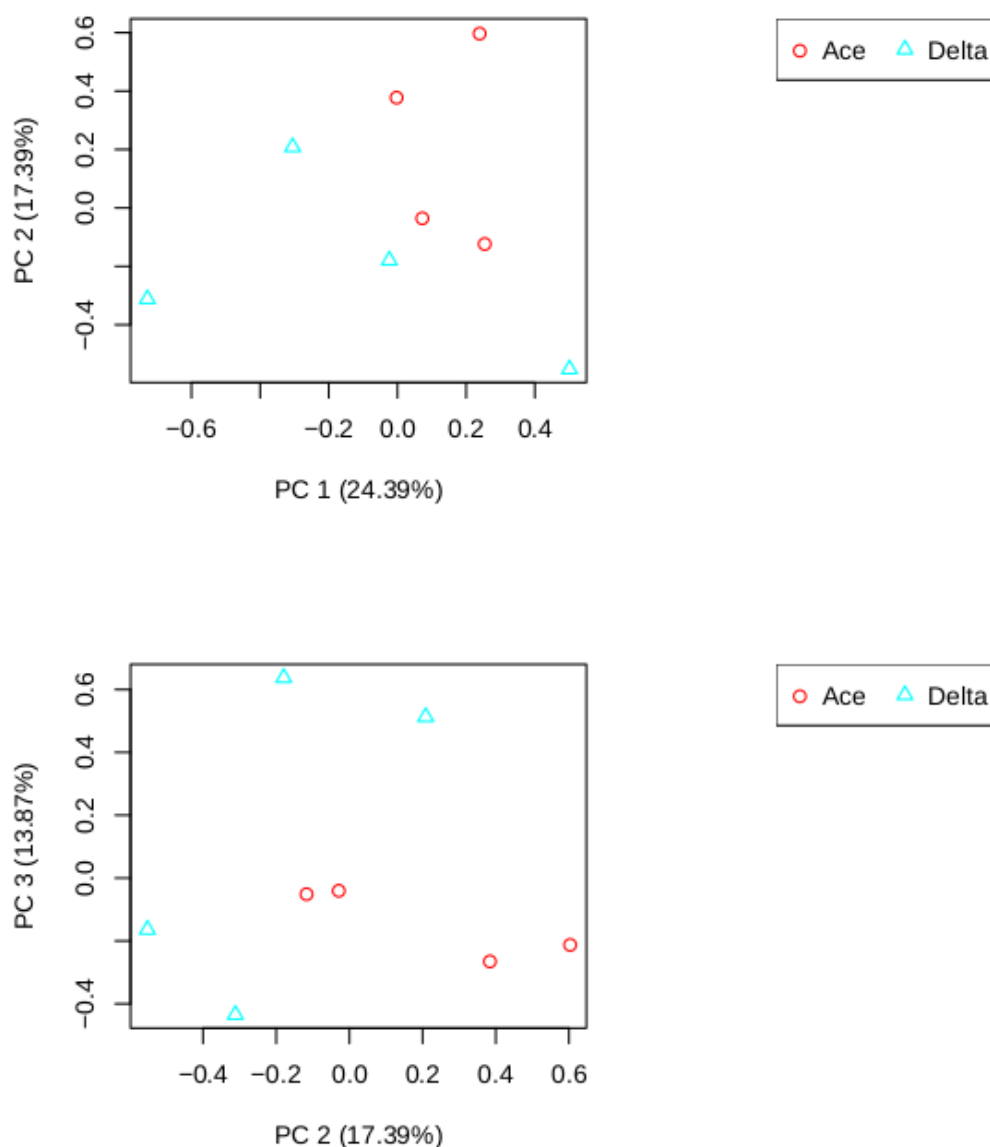


Figura 3.10. Gráfico de análisis de componentes principales de la matriz TMM con los valores de expresión correspondientes a cada isoforma para cada réplica biológica utilizada en cada muestra.

3.5.4.2 Análisis de expresión diferencial

El análisis de expresión diferencial se llevó a cabo con el paquete de R *EdgeR* *Bioconductor* (Robinson *et al.* 2009; McCarthy *et al.* 2012), utilizado con los *scripts* disponibles en el programa Trinity (ver Materiales y métodos). En un primer paso, se utilizó el script *run_DE_analysis.pl* con la matriz de contabilización de lecturas para obtener los valores estadísticos sobre la expresión diferencial entre las dos condiciones. Estos resultados se utilizan junto con la matriz de valores TMM en un segundo paso llevado a

cabo con el *script analyze_diff_expr.pl*, para extraer los resultados más significativos. Se consideraron aquellos transcritos con un *False Discovery Rate* (FDR) menor a 0,05 y un cambio relativo mínimo de 2 (logaritmo del *fold change* mayor o igual a 1).

Los resultados revelaron un total de 221 transcritos diferencialmente expresados en ambas muestras (107 sobreexpresados y 114 subexpresados en el grupo tratado con deltametrina) (Figura 3.11; Anexo I, Archivo suplementario SE2). De esos 221 transcritos, 213 poseen anotación en Transdecoder. Con la secuencia del transcripto completo y las secuencias de las proteínas obtenidas por el Transdecoder se realizaron búsquedas de *blastx* y *blastp*, respectivamente, contra la base de datos no redundante de insectos en NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Se obtuvieron 160 secuencias coincidentes en ambas búsquedas y 15 secuencias sin coincidencia con secuencias de esas bases de datos. Por otra parte, se hallaron 38 secuencias a las cuales no se puede asignar una identidad unívoca (por mostrar diferencias en las búsquedas por *blastx* y *blastp*, o por codificar más de un péptido, lo que podría indicar transcritos fusionados). De las secuencias que no poseen anotación en Transdecoder, las búsquedas de *blastx* no arrojaron ninguna coincidencia para 5 de ellas, mientras que 2 poseen coincidencias de baja calidad y una de ellas presenta dos coincidencias a diferentes secuencias de insectos, por lo que se considera una anotación ambigua. El significado de la expresión diferencial en los casos ambiguos por tanto no puede analizarse en profundidad, y serán necesarias aproximaciones adicionales para evaluar esas secuencias. Sin embargo, la mayoría de los transcritos diferencialmente expresados fueron identificados en base a sus ortólogos en otras especies, lo que permitió extraer conclusiones funcionales.

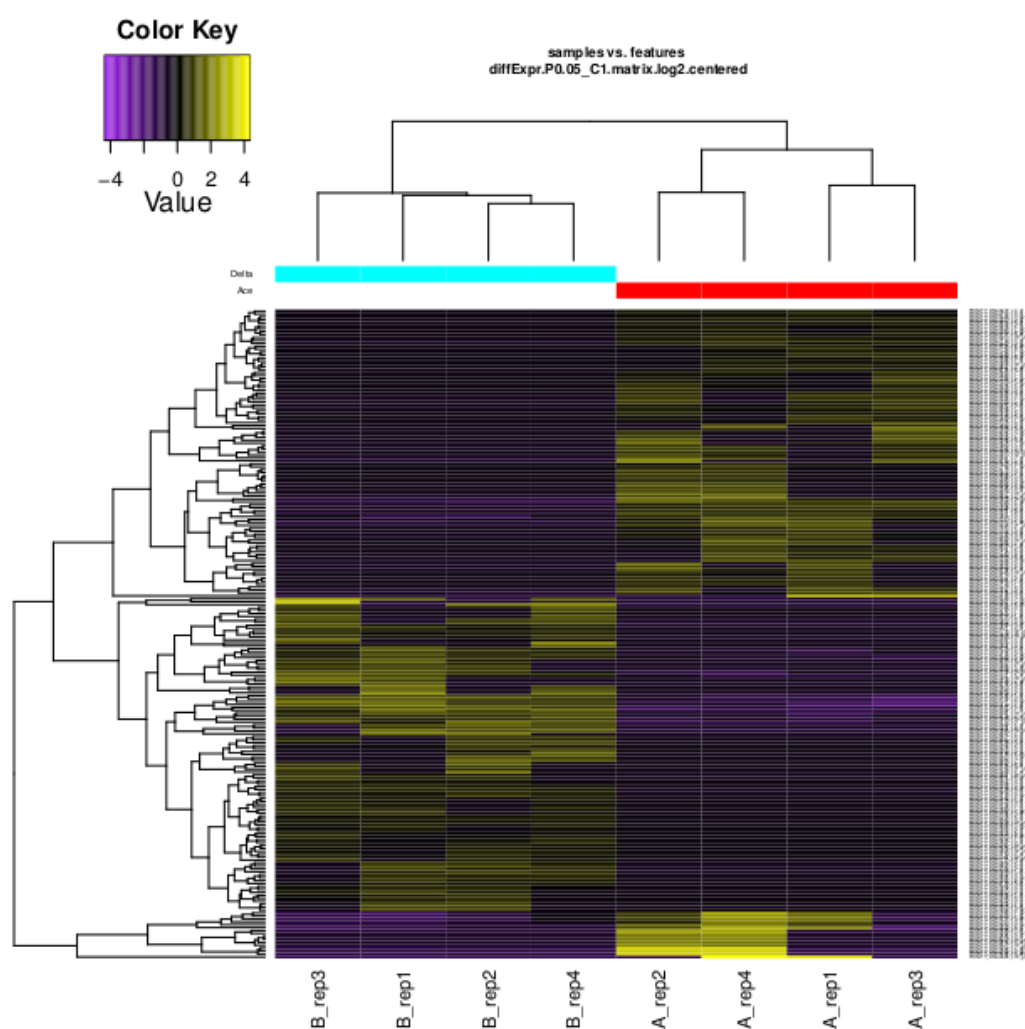


Figura 3.11. Genes diferencialmente expresados vs. réplicas biológicas. Las filas representan cada uno de los transcritos diferencialmente expresados, graficados según los valores de TMM transformados mediante \log_2 y centrados según su media. Las columnas representan cada una de las ocho réplicas biológicas utilizadas. Los valores se representan según una escala de color que va de violeta (menos expresado) a amarillo (más expresado). A= tratamiento con acetona; B=tratamiento con deltametrina.

En las Tablas Suplementarias S3.3 y S3.4 del Anexo I se muestran, para los transcritos diferencialmente expresados e identificados, la mejor coincidencia en las búsquedas *blastp* y *blastx* contra la base de datos no redundante de NCBI acotada a insectos, y la mejor coincidencia obtenida en las búsquedas de *blastp* contra las proteínas de *D. melanogaster* y *R. prolixus*.

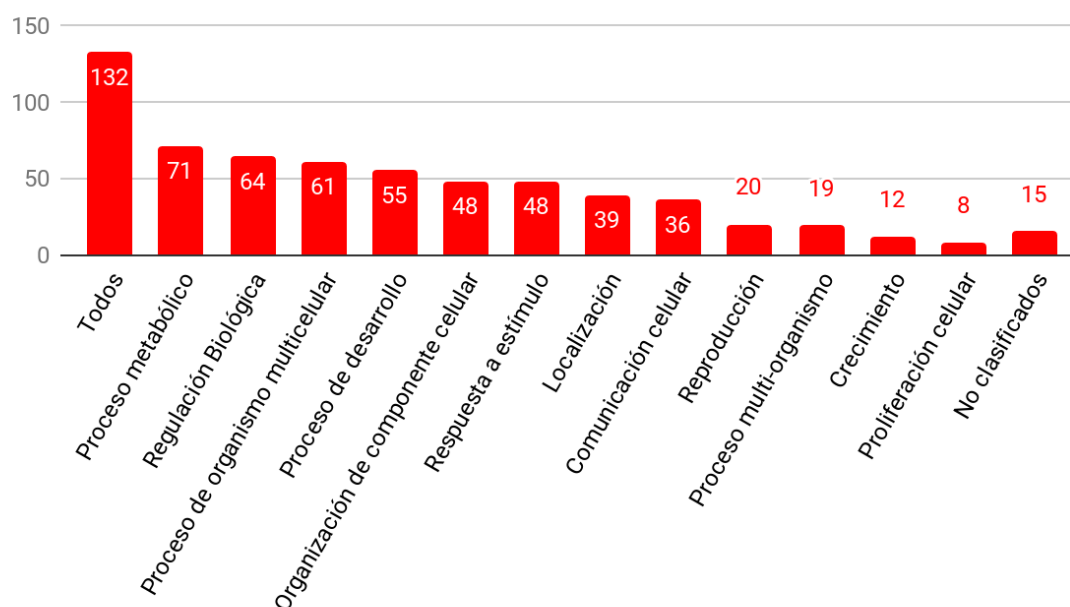
3.5.4.3 Análisis global de los transcritos diferencialmente expresados

Para obtener una interpretación global del significado biológico de los resultados se llevó a cabo un análisis de los transcritos diferencialmente expresados mediante la herramienta WebGestalt (Wang *et al.* 2017). Para ello se utilizaron los ortólogos de *D. melanogaster* para cada transcrito de *T. infestans* diferencialmente expresado. Esta estrategia se utilizó puesto que el genoma de *D. melanogaster* está anotado exhaustivamente y la mayoría de las herramientas bioinformáticas permiten realizar los análisis con esta especie.

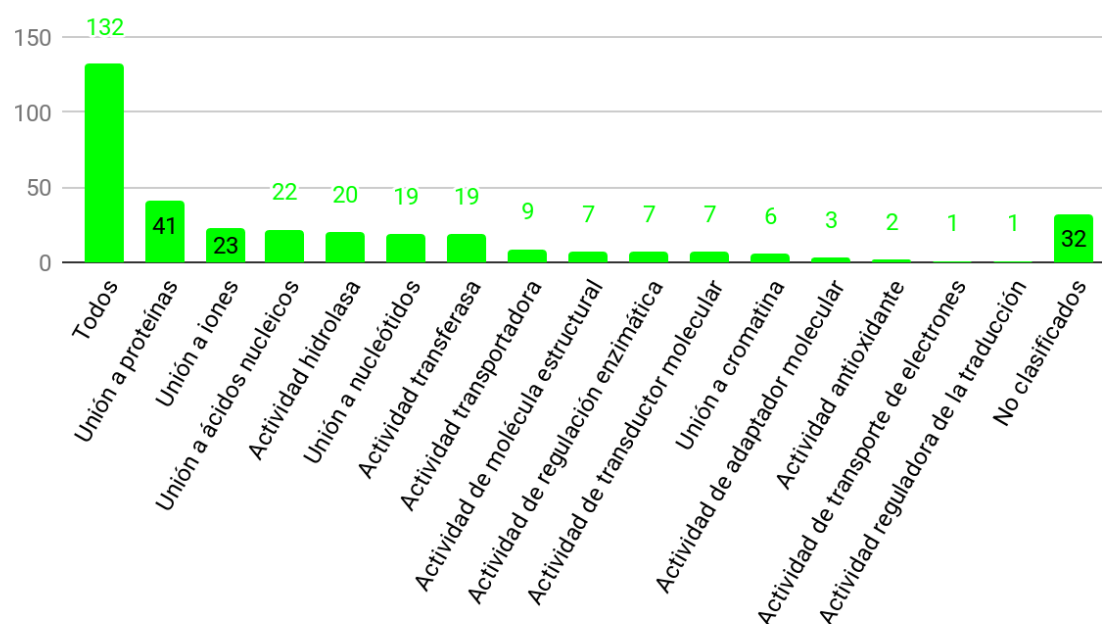
3.5.4.3.1 Clasificación de los transcritos diferencialmente expresados según términos GOslim

En primer lugar, se obtuvo una clasificación descriptiva de los homólogos identificados en *D. melanogaster* según GOslim en las categorías de proceso biológico (Figura 3.12 A), función molecular (Figura 3.12 B) y componente celular (Figura 3.12 C).

A



B



C

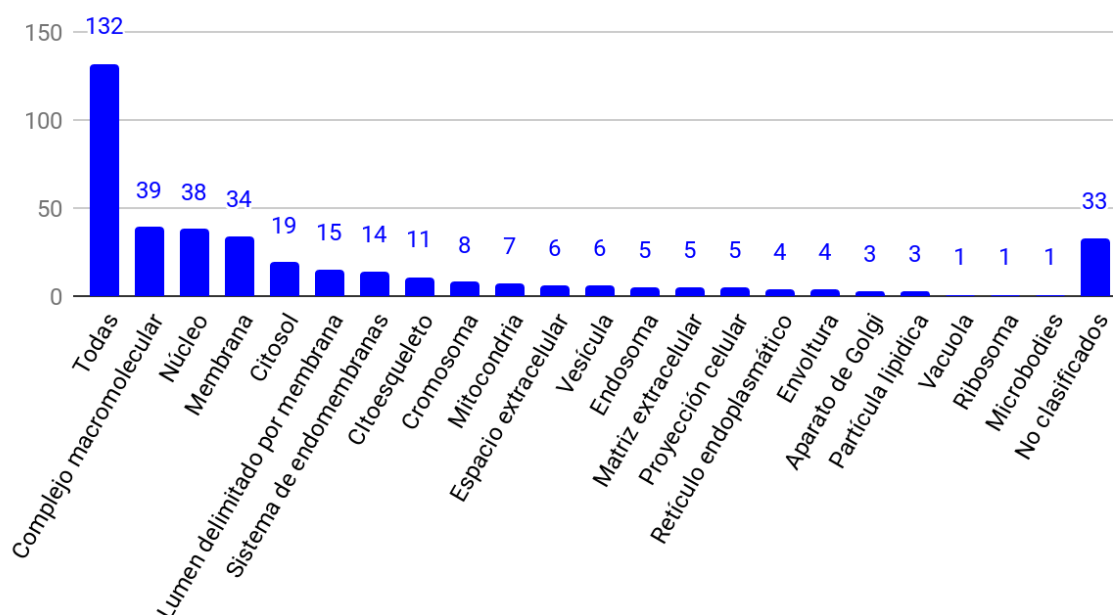


Figura 3.12. Resumen de las categorías GOslim para los genes diferencialmente expresados. Las categorías de proceso biológico (A), función molecular (B) y componente celular (C) están representadas por barras rojas, verdes y azules respectivamente. La altura de cada barra representa el número de genes observados en la categoría.

Respecto de la categoría de proceso biológico, los términos más abundantes se clasificaron en “proceso metabólico” que incluye la transformación de moléculas (considerando tanto los procesos catabólicos como anabólicos) y “regulación biológica”, que engloba todos los tipos de regulación de procesos entre los que se incluyen la expresión génica y la modificación de proteínas. Más del 40% de los términos clasificados se agrupan en la categoría “respuesta a estímulo”.

En la categoría de función molecular, “unión a proteínas” fue la categoría en la que se clasificaron la mayor cantidad de términos. Las actividades hidrolasa, transferasa y transportadora, importantes en los procesos de detoxificación, se destacan entre las más abundantes.

En la categoría de componente celular, núcleo, membrana y citosol son las ubicaciones celulares más abundantes de los términos clasificados. El citoesqueleto agrupa un 11% de los términos clasificados.

3.5.4.3.2 Análisis de enriquecimiento funcional

Utilizando el método *Overrepresentation Enrichment Analysis* (ORA) de WebGestalt se realizó un análisis de enriquecimiento funcional a partir de los transcritos diferencialmente expresados. Este se calcula teniendo en cuenta el número de genes diferencialmente expresados hallados dentro de una categoría y la cantidad total de genes clasificados en esa categoría. Utilizando un valor de FDR < 0,1 como significativo, se hallaron 10 categorías enriquecidas para proceso biológico, una para función molecular y tres para componente celular (Tabla 3.3). Los transcritos que componen cada categoría enriquecida pueden tener perfiles de expresión diferentes, es decir, mientras que algunos se hallan regulados positivamente, otros pueden estarlo de manera negativa, revelando una regulación compleja de los procesos (como por ejemplo, la subexpresión de un inhibidor que puede generar un efecto de activación). En este sentido, en las categorías enriquecidas en este análisis pueden verse algunos transcritos sobreexpresados y otros subexpresados (Anexo I, Tabla suplementaria S3.5).

Categoría GO	Identificación GO	Nombre del término	N	E	n	R	p-value	FDR
Proceso biológico	GO:0009792	Desarrollo embrionario que termina en nacimiento o eclosión de huevos	181	2,18	10	4,59	5,97E-05	1,99E-02
	GO:0048598	Morfogénesis embrionaria	233	2.8	10	3,57	4,71E-04	7,87E-02

	GO:0050890	Cognición	167	2,01	8	3,98	8,72E-04	7,90E-02
	GO:0051248	Regulación negativa de proceso metabólico proteico	262	3,15	10	3,17	1,17E-03	7,90E-02
	GO:0035272	Desarrollo del sistema exocrino	186	2,24	8	3,58	1,74E-03	7,90E-02
	GO:0044087	Regulación de la biogénesis de los componentes celulares	277	3,33	10	3	1,77E-03	7,90E-02
	GO:0030029	Proceso basado en filamentos de actina	279	3,36	10	2,98	1,87E-03	7,90E-02
	GO:0061564	Desarrollo de axones	332	3,99	11	2,76	2,07E-03	7,90E-02
	GO:0048732	Desarrollo de las glándulas	238	2,86	9	3,14	2,20E-03	7,90E-02
	GO:0031647	Regulación de la estabilidad de proteínas	47	0,57	4	7,08	2,37E-03	7,90E-02
Función molecular	GO:0008092	Unión a proteínas del citoesqueleto	317	3,97	12	3,02	5,58E-04	6,30E-02
Componente celular	GO:0099568	Región citoplasmática	172	2,11	8	3,79	1,08E-03	3,14E-02
	GO:0030054	Unión celular	218	2,68	9	3,36	1,21E-03	3,14E-02
	GO:0045177	Zona apical de la célula	136	1,67	7	4,19	1,25E-03	3,14E-02

Tabla 3.3. Categorías enriquecidas dentro de cada categoría de Gene Ontology, obtenidas según el análisis de la herramienta WebGestalt. N= Número de genes de referencia en la categoría; E=Número esperado en la categoría; n=Número hallados en la categoría; R=Radio de enriquecimiento. Se consideraron enriquecidas aquellas categorías con un valor de FDR < 0,1. El detalle de los transcritos diferencialmente expresados dentro de cada categoría se detalla en la Tabla Suplementaria S3.5 (Anexo I).

3.5.4.3.2.1 Enriquecimiento de términos relacionados a procesos de desarrollo

En el análisis de enriquecimiento de “procesos biológicos” se observan varios términos relacionados con el desarrollo y la morfogénesis embrionaria. Uno de los transcritos sobreexpresados (TRINITY_DN44495_c1_g1_i6, Tabla Suplementaria S3.5) codifica para una subunidad del colágeno IV y forma parte de la vía enriquecida “Desarrollo embrionario que termina en nacimiento o eclosión de huevos”. En el hemíptero *S. furcifera*, el tratamiento con piretroides también indujo la sobreexpresión de transcritos codificantes para subunidades de colágeno (Zhou *et al.* 2018). En mosquitos resistentes, el tratamiento con deltametrina disminuye la expresión de un transcrito codificante para la cadena alfa de colágeno (Reid *et al.* 2018). Esta proteína es el principal componente de las membranas basales (Ashhurst 1982). Resulta evidente que existe una regulación, ya sea específica o inespecífica, de los procesos de desarrollo en los insectos intoxicados. En el mosquito *Cx.*

quinquefasciatus, se ha observado que la exposición a permetrina causa una subexpresión de proteínas necesarias para el desarrollo a pupa (Reid *et al.* 2018).

A pesar de no formar parte de estos procesos enriquecidos, en nuestro análisis se halló modulada la expresión de otros transcriptos relacionados al desarrollo. Resultó subexpresado un transcripto perteneciente a la familia CYP15, que está involucrado en la síntesis de la hormona juvenil (JH) a través de su epoxidación (Helvig *et al.* 2004) y se encontró subexpresado un factor de transcripción homólogo a *crooked legs* de *D. melanogaster*, que es inducido por 20-hidroxiecdisona (20E) (Mitchell *et al.* 2008). En el hemíptero *S. furcifera*, luego de 48 hs. de la intoxicación con deltametrina se observó la sobreexpresión de una proteína inducible por ecdisona (*ecdysone inducible protein 75*) (Zhou *et al.* 2018). Los resultados sugieren que podría existir una modulación de la concentración de 20E y JH circulantes en los insectos intoxicados con deltametrina. Debido al rol fundamental de estas hormonas en los procesos de desarrollo post-embrionario (Goodman & Cusson 2012; Marchal *et al.* 2010), esto generaría un cambio profundo en procesos endocrinos y metabólicos, que podrían impactar en dicho desarrollo. En *R. prolixus* se ha observado que la muda se ve retrasada en insectos tratados con otros tipos de insecticidas (Alzogaray & Zerba 2016). La intoxicación con piretroides también podría generar un impacto en estos procesos, compatible con hipótesis alteraciones en las concentraciones de JH y 20E. En presencia de un estrés por intoxicación, la regulación de los procesos de desarrollo post-embrionario podría ser funcional para re-dirigir recursos energéticos a los procesos de detoxificación y respuesta al estrés, a fin de aumentar las posibilidades de supervivencia.

Entre las vías enriquecidas también se encuentran los términos de “desarrollo de las glándulas” y “desarrollo del sistema exocrino”. Esto podría indicar un impacto de la intoxicación en la anatomía y/o función de este sistema. Si bien no existen muchos estudios sobre estos efectos, en *A. mellifera* se observó que la intoxicación con el insecticida fipronil redujo el tamaño de las células epiteliales en las glándulas mandibulares (Zaluski *et al.* 2017).

En el insecto *Callibaetis radiatus* se observó que la intoxicación con deltametrina produce cambios citomorfológicos en el sistema nervioso y en el intestino. Es interesante destacar que en el intestino medio las alteraciones se evidencian en los insectos expuestos por 1 y 12 horas, sin embargo en los expuestos por 24 horas la degeneración parece mitigarse (Gutiérrez *et al.* 2016). En el mismo sentido, en la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* se observaron cambios citológicos en el sistema nervioso central causados por el tratamiento con permetrina, incluyendo pérdida de integridad de la membrana celular

(Roma *et al.* 2013). Asimismo, se observaron alteraciones celulares en el cuerpo graso e intestino de *Cx. quinquefasciatus* expuestos a diferentes insecticidas, incluyendo piretroides (Alves *et al.* 2010). Teniendo en cuenta estos resultados podría hipotetizarse que el proceso enriquecido “regulación de la biogénesis de los componentes celulares” en el tratamiento con deltametrina están relacionados con el daño y/o la regeneración celular causada por el tóxico.

3.5.4.3.2.2 Enriquecimiento de términos relacionados al metabolismo de proteínas

El enriquecimiento de los términos de “regulación de la estabilidad de proteínas” y “regulación negativa de proceso metabólico proteico” podría relacionarse con los procesos de degradación de proteínas, que han sido relacionados a factores estresantes entre los que se encuentran los insecticidas (Kültz 2005). Las proteasas intracelulares están relacionadas al mantenimiento homeostático, ya que mantienen la proteostasis de la célula. Frente a un factor que genera estrés, como por ejemplo los insecticidas, este equilibrio puede perturbarse (Mehlhase & Grune 2002) y entre los mecanismos de respuesta al estrés se incluye a las enzimas proteolíticas (Kültz 2005). En diferentes especies de insectos, cepas resistentes a insecticidas han mostrado niveles de proteasas intracelulares constitutivamente aumentados con respecto a las cepas susceptibles, tanto a nivel proteico como transcriptómico (revisado en Wilkins 2017). Se planteó la hipótesis de que esto puede ser debido a una adaptación de los individuos a factores estresantes y, en el caso de las proteasas, su actividad elevada podría ser útil para la producción de aminoácidos para la síntesis de sistemas de defensa (Ahmed *et al.* 1998). Asimismo, el aumento en la expresión de peptidasas luego de la intoxicación con insecticidas ha sido observado en otras especies de insectos (Silva *et al.* 2012; Valenzuela-Miranda & Gallardo-Escárate 2016). Por otra parte, una de las estructuras celulares más importantes en la degradación proteolítica es el sistema ubiquitina-proteasoma (revisado en Glickman & Ciechanover 2002). En mosquitos, se ha planteado que la vía de ubiquitina-proteasoma podría cumplir un rol importante en el fenómeno de resistencia a deltametrina, aunque el mecanismo aún no ha sido dilucidado (Sun *et al.* 2013).

Entre los transcritos subexpresados, se halló un transcrito con homología a una carboxipeptidasa. Entre los sobreexpresados, un transcrito codificante para una aminopeptidasa, y el transcrito TRINITY_DN39736_c3_g1_i7 que forma parte de estas vías enriquecidas (Anexo I, Tabla Suplementaria S3.5), codifica para una proteína del grupo 14-3-3, relacionado con la regulación de la actividad proteica (Obsilova *et al.* 2014). Varias peptidasas y un transcrito del grupo 14-3-3 también han sido hallados sobreexpresados en

S. furcifera luego del tratamiento con deltametrina (Zhou *et al.* 2018). En mosquitos de diferentes especies y niveles de resistencia a insecticidas la exposición a piretroides indujo la expresión diferencial de varios transcriptos codificantes para proteasas (David *et al.* 2010, Reid *et al.* 2018). Luego del tratamiento con deltametrina, la actividad proteolítica podría estar funcionando como un mecanismo de respuesta al estrés causado por el tóxico. En este sentido, resulta interesante estudiar este tipo de enzimas debido a que, en el caso de los piretroides, se ha observado que las proteasas de insectos resistentes pueden hidrolizar permetrina y deltametrina (Yang *et al.* 2008; Xiong *et al.* 2014).

3.5.4.3.2.3 Enriquecimiento de términos relacionados a cognición

Es interesante destacar el enriquecimiento de la vía denominada “cognición”, que incluye actividades relacionadas con la memoria y el aprendizaje. Uno de los transcriptos sobreexpresados en esta vía, homólogo a *CrebB* de *D. melanogaster*, también fue hallado sobreexpresado en *S. furcifera* luego del tratamiento con deltametrina (Zhou *et al.* 2018). Dada la existencia del fenómeno de resistencia “por comportamiento”, en la que el insecto evita el contacto con el tóxico (Gatton *et al.* 2013), el enriquecimiento observado en la categoría de procesos cognitivos en *T. infestans* podría estar relacionado con el desarrollo de la capacidad de reconocimiento del insecticida.

3.5.4.3.2.4 Enriquecimiento de términos relacionados al citoesqueleto

El enriquecimiento del proceso biológico denominado “proceso basado en filamentos de actina” y de la función molecular “unión a proteínas del citoesqueleto” podría tener relación con respuesta del citoesqueleto al estrés causado por el tóxico. Cuando la célula se expone a estrés, el citoesqueleto se desorganiza y en este proceso algunas *heat shock proteins* (HSPs) podrían tener un rol protectorio (Mounier & Arrigo 2002). Se ha observado que algunas moléculas insecticidas pueden actuar sobre el citoesqueleto de células humanas (Cabello *et al.* 2003; Flaskos 2014; Ilboudo *et al.* 2014). En insectos, se ha observado a nivel proteómico la modulación de actina como respuesta a la intoxicación con la toxina Cry de *Bacillus thuringiensis* (Yuan *et al.* 2011; Cancino-Rodezno *et al.* 2012) y en *Ae. aegypti* también se ha observado un incremento de espectrina (Cancino-Rodezno *et al.* 2012), el mayor componente de la red proteica que cubre la superficie citoplasmática de las membranas celulares unidas a filamentos cortos de actina. Esta red se une a la bicapa de la membrana celular mediante otras proteínas, como por ejemplo ankirina (Doherty & McMahon 2008), cuyo homólogo se ha hallado subexpresado en este trabajo de Tesis en el tratamiento con deltametrina.

Otros ejemplos de transcritos subexpresados en el tratamiento con el piretroide son homólogos a los genes *Jupiter*, *drk* y *Fhos* de *D. melanogaster*. Estos genes tienen en común funciones relacionadas con el citoesqueleto: regulación de su organización, unión a proteínas relacionadas y/o inducción de la formación de fibras de estrés (Karpova *et al.* 2006; Koch *et al.* 2008; Pielage *et al.* 2008; Lammel *et al.* 2014). En *S. furcifera*, la respuesta transcripcional a la intoxicación con deltametrina también mostró subexpresión de un transcripto homólogo a *Jupiter* (Zhou *et al.* 2018). Entre los transcritos sobreexpresados se hallaron homólogos de *Myo61F* y *zip* (del grupo de las miosinas) y *mys* (subunidad β del dímero de integrina). En *D. melanogaster*, se ha encontrado que los mutantes de *Myo61F* son más susceptibles a infección bacteriana (Hegan *et al.* 2007). Las integrinas son receptores transmembrana que funcionan como una conexión entre la matriz extracelular y el citoesqueleto (Hynes 2002). En *Spodoptera exigua* se ha reportado que el silenciamiento de una integrina aumenta la toxicidad de la toxina Cry de *B. thuringiensis* (Kim *et al.* 2015). En este trabajo también se encontró sobreexpresado un homólogo al gen *zormin* de *D. melanogaster*, que forma parte del músculo en esa especie (Kreisköther *et al.* 2006; Burkart *et al.* 2007). En la abeja *A. mellifera*, dosis subletales del insecticida imidacloprid afectan la contracción muscular, lo que ha sido asociado con una subexpresión de transcritos de unión a actina, relacionados a inserción muscular y homólogos de titina (Wu *et al.* 2017).

En conjunto, estos resultados muestran una respuesta del citoesqueleto y proteínas asociadas al tratamiento con insecticida en *T. infestans* y podrían plantear candidatos interesantes para estudiar la respuesta celular a este compuesto.

3.5.4.3.2.5 Enriquecimiento de términos "zona apical de la célula" y "unión entre células"

Al analizar la categoría de componente celular, se observa enriquecido el término "zona apical de la célula". Esto podría indicar el lugar de la célula en que están ocurriendo los procesos de respuesta al tóxico en los tejidos. Otro componente celular enriquecido es citosol, lo que indica que varios de los transcritos diferencialmente expresados representan procesos que ocurren en ese espacio. "Unión entre células", término que refiere a la conexión entre dos o más células o con la matriz extracelular, también se encuentra enriquecido, y podría indicar que estas uniones representan una respuesta importante a la intoxicación.

3.5.4.4 Análisis de transcriptos diferencialmente expresados que no forman parte de los procesos enriquecidos

Si bien el análisis de enriquecimiento permite agrupar transcriptos para evaluar de forma global algunos procesos destacados, existen muchos transcriptos diferencialmente expresados que no forman parte de un proceso enriquecido, aunque pueden tener un papel en la respuesta al tóxico. A continuación, se realizará una descripción de algunos de ellos y se agruparán en categorías según sus posibles funciones, a fin de facilitar la interpretación de los resultados.

3.5.4.4.1 Enzimas detoxificativas

La familia CYP4 ha sido relacionada con la respuesta a insecticidas y el fenómeno de resistencia en distintas especies de insectos, incluyendo *T. infestans* (Feyereisen 2012; Grosso *et al.* 2016; Traverso *et al.* 2016; Dulbecco *et al.* 2018). Nuestros resultados indican una subexpresión de dos transcriptos pertenecientes a esta familia frente a la intoxicación con deltametrina, lo cual es opuesto a lo previamente reportado en *T. infestans* (Grosso *et al.* 2016; Dulbecco *et al.* 2018). No obstante, esos ensayos fueron realizados con tejidos individuales y en otros estadios de desarrollo.

En coincidencia con nuestros resultados, la disminución en la expresión de un CYP de la familia 4 luego de 48 horas de la intoxicación con deltametrina también fue evidenciada a nivel transcriptómico en el hemíptero *S. furcifera*, mientras se observó un aumento de un transcripto de la familia 3 (Zhou *et al.* 2018). Cinco transcriptos CYP de la familia 4, uno de la familia 9 y uno de la familia 15 se encontraron subexpresados 24 hs. después de una exposición a piretroides en *Cx. quinquefasciatus*, mientras otros (sobre todo de la familia 6, pero también de la 4 y de la 325) presentaron una sobreexpresión (Reid *et al.* 2018). En el mosquito *Ae. aegypti*, luego de 48 horas del tratamiento con dosis subletales de diferentes tipos de insecticidas incluyendo permetrina, se observó una subexpresión de un gen de la familia CYP4, mientras que otros transcriptos de la superfamilia (CYP6 y CYP9) se encontraron regulados positivamente (David *et al.* 2010). Teniendo en cuenta los resultados previos de nuestro grupo y de otros (Traverso *et al.* 2016, Grosso *et al.* 2016, Zhou *et al.* 2018, Dulbecco *et al.* 2018, Reid *et al.* 2018), y los resultados del presente análisis, consideramos posible que exista una regulación global coordinada de los genes de la familia CYP4. Los genes que están más directamente relacionados con la detoxificación

podrían aumentar su expresión luego de que disminuya la de otros genes de la misma familia pero con menor o nula actividad detoxificativa.

Ninguno de los transcritos diferencialmente expresados pertenece a otros CYPs, a excepción del ya descrito CYP15 (ver punto 3.5.4.4), que no ha sido relacionado con la respuesta a insecticidas. Tampoco se observaron diferencias en la expresión de transcritos de las superfamilias detoxificativas GST y CCE. Es posible que el tiempo analizado (4 horas post-intoxicación) sea muy breve como para evidenciar cambios en la expresión génica de estas superfamilias. No se puede descartar que las alteraciones podrían observarse a partir de tiempos más largos post-exposición. Los niveles de expresión de los genes pertenecientes a estas superfamilias en las muestras analizadas se graficaron en los mapas de calor de las Figuras Suplementarias S3.1 a S3.5 (Anexo I).

3.5.4.4.2 Transcritos relacionados al transporte celular

Un proceso importante relacionado a la metabolización de xenobióticos es el transporte a través de las membranas. Como ya se mencionó, algunos transportadores tienen un rol fundamental en los procesos de movilización de los tóxicos: pueden actuar en fase 0 (evitando que el tóxico ingrese a la célula) o en fase III (expulsándolo hacia el medio extracelular, luego de ocurridas las fases I y II) (Kennedy & Tierney 2013). Los miembros de la superfamilia de transportadores *solute carriers* (SLC) involucrados en el transporte de drogas son principalmente los *organic anion transporters* (OAT) y los *organic cation transporters* (OCT) (subfamilia 22) (Kennedy and tierney). Entre los transcritos sobreexpresados se observan varios codificantes para proteínas transportadoras SLC, ortólogos a los de las subfamilias SLC 5 (*sodium-coupled monocarboxylate transporter 2*), 9 (*sodium/hydrogen exchanger 8*), 16 (*monocarboxylate transporter 9*) y 26 (*sodium-independent sulfate anion transporter*). Si bien ninguno de ellos ha sido relacionado a movilización de tóxicos hasta el momento, podrían ser candidatos interesantes para estudiar respecto de este fenómeno.

3.5.4.4.3 Transcritos asociados al estrés oxidativo

Entre los transcritos que se han encontrado diferencialmente expresados resulta interesante destacar aquellos involucrados en el control del estrés oxidativo. Se ha planteado que el estrés oxidativo podría ser una de las causas de la toxicidad de organoclorados, organofosforados y piretroides (Hai *et al.* 1997; Bachowski *et al.* 1998; Vontas *et al.* 2001). En este sentido, entre los transcritos diferencialmente expresados se observa una regulación positiva de la expresión génica de transcritos relacionados a la

cadena transportadora de electrones: se ha hallado sobreexpresado un transcripto homólogo a *coq6*, que participa en la síntesis de ubiquinona (componente de la cadena transportadora de electrones) y un transcripto homólogo a un factor de ensamblado del complejo I de dicha cadena. En el mismo sentido, la NADH deshidrogenasa, que transfiere electrones a la ubiquinona, se encontró sobreexpresada en poblaciones de *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus* luego de la exposición a piretroides (David *et al.* 2010; Reid *et al.* 2018). El transporte de electrones en la mitocondria contribuye al estrés oxidativo (Shigenaga *et al.* 1994; Larosa & Remacle 2018), por lo que la regulación de estos transcriptos podría estar relacionada con el aumento de este estrés causado por el insecticida. Asimismo, estos transcriptos están relacionados con la generación de energía, aspecto analizado en el siguiente punto.

Se encontró sobreexpresado un transcripto (TRINITY_DN44938_c2_g3_i7), homólogo a la Apolipoproteína D de vertebrados, denominado *NLaz* en *D. melanogaster*. En la mosca, se ha hallado que esta proteína responde al estrés oxidativo y participa en la tolerancia al estrés, ajustando el metabolismo de glucosa y el crecimiento en respuesta a factores estresantes (Hull-Thompson *et al.* 2009). Homólogos a estos transcriptos también se vieron sobreexpresados en *Cx. quinquefasciatus* luego del tratamiento con deltametrina (Reid *et al.* 2018). Lo anterior sugiere que esta proteína puede ser interesante para el estudio de la respuesta a la intoxicación. En nuestro trabajo también se halló subexpresado un transcripto homólogo al gen *DJ-1* de *D. melanogaster*, que cumple un rol importante en la respuesta al estrés oxidativo (Menzies *et al.* 2005; Yang *et al.* 2005; Lavara-Culebras & Paricio 2007). Serán necesarios más aproximaciones experimentales para dilucidar el rol de este gen en la respuesta a insecticidas.

Dado que algunos neuropéptidos poseen un rol reportado en la respuesta al estrés causado por el insecticida (revisado en Kodrík *et al.* 2015) se exploró la expresión de los mismos sin hallarse diferencias significativas entre los tratamientos para ninguno de ellos (Anexo I, Figura Suplementaria S3.6).

3.5.4.4.4 Metabolismo

Se han hallado sobreexpresados transcriptos involucrados en el metabolismo de ácidos grasos (como por ejemplo acil-CoA deshidrogenasa y sintetasa). Ejemplos de algunos de los transcriptos subexpresados se encuentran relacionados con la elongación de ácidos grasos, actividad hidrolasa y deshidrogenasa. También se ha hallado subexpresado un transcripto homólogo a aldosa reductasa. Se observó que este transcripto se encuentra sobreexpresado en varios experimentos de *microarrays* de poblaciones resistentes a

piretroides de *Anopheles coluzzii* (Ingham *et al.* 2018). Por otra parte, como se mencionó en el punto anterior, la sobreexpresión de transcriptos relacionados a la cadena transportadora de electrones se evidenció tanto en nuestro trabajo como en reportes previos en mosquitos tratados con piretroides (David *et al.* 2010; Reid *et al.* 2018). Esto puede sugerir que el estímulo de la intoxicación con un insecticida de este tipo podría activar la producción de energía.

La regulación de transcriptos asociados a reacciones metabólicas ha sido relacionada con el tratamiento con insecticidas y el fenómeno de resistencia. Por ejemplo, el tratamiento con insecticida anti-colinesterasa sobre *Myzus persicae* generó cambios en la expresión génica consistentes con un aumento del metabolismo en general y una movilización de depósitos de energía (Silva *et al.* 2012). Los autores sugieren que la movilización de energía podría mitigar los costos generados por la acción del insecticida, como la contracción muscular y la detoxificación (Silva *et al.* 2012). Asimismo, el fenómeno de resistencia a insecticidas ha sido asociado a mayores demandas de energía en otras especies de insectos (Guedes *et al.* 2006; Araújo *et al.* 2008; Lopes *et al.* 2010).

3.5.4.4.5 Sistema sensorial

Otros transcriptos interesantes que se encontraron diferencialmente expresados fueron algunos relacionados al sistema sensorial. Por un lado, se observa una sobreexpresión de un transcripto codificante para una proteína OBP (del inglés *odorant binding protein*). En cuanto a las proteínas quimiosensoriales, se halló un transcripto sobreexpresado y otro subexpresado. Esto es consistente con lo observado en el hemíptero *S. furcifera*, que a las 48 horas de la exposición con piretroides presenta subexpresión de algunas proteínas quimiosensoriales y sobreexpresión de otras (Zhou *et al.* 2018). Asimismo, el análisis transcriptómico realizado en *Cx. quinquefasciatus* resistentes mostró un transcripto codificante para una proteína quimiosensorial subexpresado y transcriptos codificantes para OBPs sobre- y subexpresados luego de 24 horas de exposición a permetrina (Reid *et al.* 2018). Estos resultados podrían indicar una interacción entre el tóxico y estas proteínas, tal como se ha observado en abejas para el caso de los neonicotinoides (Li *et al.* 2015). Esta interacción podría ser interesante para estudiar el reconocimiento sensorial de la molécula insecticida por parte del insecto. Por otra parte, estas moléculas se han propuesto recientemente como posibles blancos para el control de insectos (Zhou *et al.* 2010).

3.5.4.4.6 Señalización celular y endocitosis

Como se mencionó, existe una modulación de transcriptos relacionados al citoesqueleto luego del tratamiento con deltametrina en *T. infestans* (ver punto 3.5.4.4). Esta estructura se encuentra relacionada con el movimiento de vesículas dentro de la célula (Granger *et al.* 2014). La vía endocítica es esencial para definir procesos que están relacionados a la respuesta de la célula al ambiente (señalización, recambio de proteínas de membrana, entrada de patógenos, etc.). En este trabajo se hallaron sobreexpresados transcriptos relacionados al proceso de endocitosis: homólogos de los genes *Vps50*, *nuf* y *CG31064* de *D. melanogaster* que están relacionados a procesos endocíticos y/o a unión a proteínas Rab, reguladoras fundamentales del proceso endocítico (Riggs *et al.* 2003; Gillingham *et al.* 2014). Entre los transcriptos subexpresados se hallaron homólogos a aquellos codificados por los genes *Sec71*, *CG33298*, *Sbf* y *Gmap* en *D. melanogaster*. Entre las funciones de estos genes se encuentra el transporte intracelular de proteínas, la regulación positiva de la endocitosis, el transporte mediado por vesículas y la unión a proteínas Rab (Friggi-Grelín *et al.* 2006; Sinka *et al.* 2008; Jean *et al.* 2012; Ma *et al.* 2012; Wang *et al.* 2017b). La regulación de estos procesos en la respuesta a la intoxicación es interesante, y podría permitir un mejor conocimiento de los mecanismos por los cuales el insecto moviliza proteínas en respuesta a la intoxicación.

Varios transcriptos relacionados a vías señalizadoras se han hallado diferencialmente expresados en el tratamiento con deltametrina. Entre los transcriptos sobreexpresados, se encuentran los homólogos *14-3-3ζ* y *kurtz* de *D. melanogaster*. El primero ha sido asociado a la regulación positiva de la señalización mediada por Ras/MAPK (Ashton-Beaucage *et al.* 2014), y el gen *kurtz*, que codifica una β-arrestina, está involucrado en la internalización de receptores acoplados a proteína G causando su desensibilización, y en el control de otras vías de señalización como las de Notch, receptor tirosin kinasa, Hedgehog y Toll (Mukherjee *et al.* 2005; Cheng *et al.* 2010; Tipping *et al.* 2010; Anjum *et al.* 2013). Se encontraron varios transcriptos subexpresados cuyos homólogos en *D. melanogaster* son receptores o se relacionan con vías de señalización y su regulación. Entre ellos se encuentran por ejemplo *5-HT2B* (receptor de serotonina; GPCR), *Cad96Ca* (Receptor tirosin kinasa) y *dnc* (fosfodiesterasa específica de AMP cíclico). La expresión diferencial de transcriptos involucrados en vías de señalización plantea procesos interesantes a ser estudiados en la respuesta a deltametrina. Serán necesarios estudios funcionales para investigar si estos resultados se evidencian como respuesta a la intoxicación, o si son consecuencia de la sobreactivación nerviosa originada por el piretroide.

3.5.4.4.7 Cutícula

Otro hallazgo interesante es la expresión diferencial de transcritos relacionados a la estructura cuticular del insecto. Se halló sobreexpresado un transcrito homólogo al gen *Drome-Cpr49Aa*, que posee dominios coincidentes con proteínas estructurales de la cutícula. Por otro lado, se halló subexpresado un transcrito homólogo al gen *Drome-mmy*, que interviene en el metabolismo de quitina (Araújo *et al.* 2005; Devine *et al.* 2005; Tønning *et al.* 2006; Shaik *et al.* 2011). En coincidencia, en los experimentos que evaluaron la respuesta transcripcional a piretroides realizados en *S. furcifera* y *Cx. quinquefasciatus* se hallaron proteínas cuticulares sobre y subexpresadas luego de los tratamientos (Zhou *et al.* 2018, Reid *et al.* 2018). En el coleóptero *Leptinotarsa decemlineata* se ha observado una inducción en la expresión de genes cuticulares luego del tratamiento con un insecticida organofosforado y del estrés producido por desecación (Zhang *et al.* 2008). En *Tenebrio molitor*, se ha hallado una sobreexpresión de un gen codificante para una proteína de unión a quitina en respuesta a la intoxicación por la protoxina Cry3Aa de *B. thuringiensis* (Oppert *et al.* 2012). En el mismo sentido, la ingestión de esta bacteria por parte del insecto *Helicoverpa armigera* modula la expresión de una enzima quitina desacetilasa, que influencia la estructura de la cutícula (Han *et al.* 2015). En un estudio de la respuesta de *Tribolium castaneum* a *B. thuringiensis* se hallaron subexpresados genes cuticulares, lo que fue asociado a una detención del desarrollo de las larvas (Contreras *et al.* 2013).

Los mecanismos de síntesis y degradación de la cutícula se consideran como procesos interesantes para pensar el diseño de nuevos insecticidas, ya que no serían tóxicos sobre vertebrados. Esto representaría una ventaja sobre los insecticidas neurotóxicos (Cohen 1993; Kramer & Muthukrishnan 1997). Además, la cutícula representa la primera barrera de protección de los insectos frente a la desecación y a la penetración de neurotóxicos. Existen algunos insecticidas que actúan inhibiendo la síntesis de quitina; algunos de ellos han sido probados como efectivos en *R. prolixus* (revisado en Alzogaray & Zerba 2016). Además, se ha demostrado que la quitinasa podría actuar como sinergista de moléculas bioinsecticidas (Lertcanawanichakul *et al.* 2004; Thamthiankul *et al.* 2004). En este sentido, resulta interesante estudiar los mecanismos de respuesta a insecticidas neurotóxicos relacionados a estos procesos para aportar conocimiento al diseño de sinergistas o de nuevas moléculas insecticidas.

3.5.4.4.8 Canal de sodio dependiente de voltaje

Es interesante destacar que se halló sobreexpresado un transcrito codificante para el canal de sodio dependiente de voltaje que, como se ha dicho, es el sitio de acción de los

insecticidas piretroides (Soderlund 2008). En un estudio reciente desarrollado en el hemíptero *Rhopalosiphum padi*, se caracterizaron dos genes codificantes para dos subunidades distintas de este canal y se observó una modulación de la expresión de ambos genes luego del tratamiento con el piretroide beta-cipermetrina (Zuo *et al.* 2016). Los autores sugieren que esta modulación podría mantener el estado de equilibrio iónico del organismo. El silenciamiento de los genes codificantes para estas subunidades mediante la técnica de ARN de interferencia disminuyó la susceptibilidad de los insectos al tóxico. Los autores proponen que la disminución del sitio de acción del piretroide reduce el efecto sobre estimulador de los nervios que termina causando la muerte (Zuo *et al.* 2016).

En el caso de insecticidas organofosforados, se ha observado que la sobreexpresión de su sitio de acción, la enzima acetilcolinesterasa, está relacionada con la resistencia a insecticidas en el áfido *Aphis gossypii* (Shang *et al.* 2014) y que el tratamiento con altas concentraciones de cicloxaprida incrementa la expresión de dicha enzima en *S. furcifera* (Yang *et al.* 2016). Nuestros resultados, junto con la evidencia obtenida por otros autores, plantea nuevas hipótesis interesantes a estudiar sobre la respuesta a insecticidas piretroides en triatominos y la modulación de la expresión del sitio de acción como posible mecanismo de respuesta a los tóxicos. Puesto que la funcionalidad del canal está afectada por el piretroide, un aumento en su expresión podría compensar los efectos de envenenamiento.

3.5.4.4.9 Inmunidad

La relación entre insecticidas sintéticos con el fenómeno de resistencia asociado al incremento de enzimas con función hidrolítica u oxidativa y su impacto en la inmunidad mediada por el estrés oxidativo aún no es clara (James & Xu 2012). En *R. prolixus* se ha observado una disminución del número de hemocitos luego de la exposición a azadiractina, un insecticida botánico (De Azambuja *et al.* 1991). Por otra parte, la expresión de genes relacionados al sistema inmune de *A. mellifera* se vio reprimida en respuesta a la exposición a insecticidas neurotóxicos (Aufauvre *et al.* 2014). En nuestro trabajo se hallaron subexpresados transcriptos homólogos a *Tep2* y *Fhos* de *D. melanogaster*, relacionados a la inmunidad en esa especie (Bou Aoun *et al.* 2010; Lammel *et al.* 2014). En *Cx. quinquefasciatus* resistentes a permetrina, la exposición a este piretroide produce cambios en el sistema inmune a través de la sobreexpresión de genes (Reid *et al.* 2018).

Se ha planteado que la capacidad de los insecticidas de disminuir la inmunidad podría tener efectos sobre la transmisión de enfermedades entre los vectores, si las exposiciones ambientales al tóxico no son suficientes para matar a los insectos (James &

Xu 2012). Conocer el impacto de la intoxicación con insecticidas en la respuesta inmune de los insectos podría brindar información valiosa para el campo del control de insectos. Se han ensayado aproximaciones que combinan intoxicación con insecticida y patógenos, como en el caso del imidacloprid y los hongos entomopatógenos para el control de plagas del suelo (Boucias *et al.* 1996; Quintela & McCoy 1997; Koppenhöfer *et al.* 2000).

3.5.4.4.10 Regulación de la expresión génica

El análisis de las secuencias diferencialmente expresadas indica que esta respuesta involucra transcritos relacionados a procesos de transcripción de genes y su regulación (Tablas suplementarias S3.3 y S3.4 en Anexo I). Algunos de los transcritos que se han hallado sobreexpresados son homólogos de los genes de *D. melanogaster* *CrebB*, *cbt* y *Rbp1*, mientras que los subexpresados son homólogos de los genes *cpo*, *Mi-2*, *hth* y *msi*, entre otros. En el mismo sentido, un factor de transcripción de tipo Creb y varias Rbp se hallaron sobreexpresadas en *S. furcifera* luego del tratamiento con deltametrina (Zhou *et al.* 2018).

3.5.4.4.11 Transcritos codificantes para proteínas con función desconocida

Entre los transcritos diferencialmente expresados también se encontraron proteínas conservadas aunque de función desconocida. La expresión de genes sin función identificada hasta el momento fue observada en varios estudios transcriptómicos de este tipo (como por ejemplo David *et al.* 2010, Reid *et al.* 2018, Zhou *et al.* 2018). El estudio de su rol en la respuesta a insecticidas se plantea como una perspectiva futura interesante que podría abordarse con técnicas de estudio de la función génica, como por ejemplo el ARN de interferencia.

3.6 Conclusiones

- El transcriptoma generado constituye una base de datos completa y confiable para el estudio de las secuencias y expresión de genes de *T. infestans*. Dada la ausencia de la secuencia genómica para este insecto, el transcriptoma de ninfas de I estadio enteras resultante de este trabajo es el más completo hasta la fecha para la especie, lo que reviste relevancia en pos del descubrimiento y caracterización de nuevas familias génicas.
- La intoxicación con deltametrina dispara una respuesta transcriptómica compleja luego de 4 horas en *T. infestans*. Muchos de estos transcritos pueden no estar directamente relacionados con el proceso detoxificativo en sí mismo, pero podrían reflejar una respuesta temprana a la intoxicación que prepara al organismo para eliminar al tóxico, con la modulación de otros genes en una etapa posterior.
- Los cambios observados a nivel de expresión revelan nuevos genes involucrados en el fenómeno de resistencia a insecticidas en triatominos y permiten plantear nuevas hipótesis sobre un posible rol de procesos poco estudiados en relación a este fenómeno. La mayoría de los resultados son coherentes con observaciones reportadas previamente dentro del campo de estudio y permiten reforzar hipótesis existentes al mismo tiempo que plantear nuevas líneas de exploración.

Capítulo 4:

Análisis funcional del neuropéptido ITG-*like* en *R. prolixus*

4.1 Introducción

4.1.1 El neuropéptido ITG-like

Existen familias génicas conservadas en insectos que presentan las características estructurales de neuropéptidos (péptido señal, sitios de clivaje por endopeptidasas) y han sido identificadas en los últimos años gracias a las nuevas tecnologías de secuenciación, aunque su función no ha sido descrita para ninguna especie. Uno de ellos es ITG-like, identificado por primera vez en la abeja *A. mellifera* (Hummon *et al.* 2006). A pesar de estar altamente conservado en especies de diferentes órdenes de la clase Insecta (Figura 4.1), aún no existen estudios funcionales reportados.

<i>B. mori</i>	MSHFAMTATAILVLGCLSGAHAWGGLFNRFSSDMLANLGYGRSPYRHYPYGQVEPDEAYE	60
<i>R. prolixus</i>	-----MLSVILLLTIGVQAAFGWGGLFNRFSPMLSNLGYGGHSSYRVQPFLQNNGAME	55
<i>T. castaneum</i>	MRA---LIILFTACLLGHKAHAWGGLFNRFSPMLANMGYGGHGGFIQRTGDEDEKGILEE	57
<i>S. invicta</i>	MKACAVITLVLVANTAYIGVEAWGGLFNRFSPMLSNLGYGGHGGYMNRPGLLQQSELQE	60
	: . . ***** :*:*:*** : . *	
<i>B. mori</i>	ALENNRISNVIDEPAHCYSSPCVTNGDCCGGLLCLETDDG-GRCLSAFAGRKLGEICNRE	119
<i>R. prolixus</i>	TLQ-EL--QEAEEMEGPCYGKRCTANEHCCPGSVCDVDGM-GSCLFPY-GLQGELCRRH	110
<i>T. castaneum</i>	-Y-----TNEGEEPCYGKPCTANEHCCPGSVCDVDGV-GSCLFAY-GRRVGELCRRD	108
<i>S. invicta</i>	GYG-GMYEGVESTEEPCEYERKCVYNDHCCPGSICVNLDGVVGTCTCFDF-GMKQELCRRD	118
	** * . * . ** * :*: : * . * *: : * ** :*. * .	
<i>B. mori</i>	NQCDAGLICEEAAPGE-MHICRPSTGRKQYNEDCTTSSECEITRGLCCIMQRRHRQKSR	178
<i>R. prolixus</i>	SDCDTGLICSDT--GDGAKTCQPPFTAPKQYSEECTMSSECDIHRGLCCQFQRRHRQAAR	168
<i>T. castaneum</i>	SDCESGLVCAEAEPGVSTRVCRPPVHQDKQYSEPCNMSSECDISRGLCCQLQRRHRQAPR	168
<i>S. invicta</i>	SDCETGLMCAEM-PGRETKSCQPPTTSNKLYNEECTMSSECDISRGLCCQLQRRHRQTTPR	177
	.:*:*:*: * : * :*:** * * . * . ***** :***** *	
<i>B. mori</i>	K-SCGYFKEPLVCIGPVAIDQIREYVEHTTGEEKRIGAYRLH-----	218
<i>R. prolixus</i>	KVICSYFKDPMVCIGPVASDQVKDDIERTAGEKRITGKTAAFNHLRR--	215
<i>T. castaneum</i>	K-VCSYFKDPLVCIGPVASDQIKSNIQHTAGEKRLTGLAGFKRPM-H--	213
<i>S. invicta</i>	K-VCSYFKDPLVCIGPVATDQIKSVIQYTSGEKRITGQGNRLFKRMPYA	225
	* * . ** :*:***** ** :. : : * :***** :	

Figura 4.1. Alineamiento múltiple de las secuencias proteicas de ITG-like de los insectos *R. prolixus* (hemíptero), *Bombyx mori* (lepidóptero), *Tribolium castaneum* (coleóptero) y *Solenopsis invicta* (himenóptero). Las secuencias fueron extraídas del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) para el caso de *B. mori* (XP_012544836.1), *T. castaneum* (XP_008196375.1) y *S. invicta* (XP_011164035.1). La secuencia de *R. prolixus* fue extraída del transcriptoma de antena ensamblado por Latorre Estivalis *et al.* (2017). El alineamiento fue realizado con el software *Clustal Omega* (v1.2.4).

En *R. prolixus* se ha observado que ITG-like es liberado desde el sistema nervioso luego de la ingesta de sangre (Sterkel *et al.* 2011). Además, hemos reportado que *T.*

infestans de una población altamente resistente a deltametrina presentan una expresión aumentada del gen precursor de este neuropéptido, en comparación con una cepa susceptible (Traverso *et al.* 2016). Hasta el momento no se ha analizado si esta expresión diferencial representa un significado funcional, o si se trata de una variación poblacional no relacionada con el fenómeno de resistencia.

Los indicios mencionados sugieren que ITG-like podría estar involucrado en procesos detoxificativos, tanto de neurotóxicos como de metabolitos generados por la ingesta de sangre. Por lo tanto, en el presente capítulo estudiamos la función de ITG-like en la fisiología de *R. prolixus* utilizando la técnica de silenciamiento génico por ARN de interferencia (ARNi), con especial énfasis en su posible papel en la detoxificación de piretroides.

4.1.2 La técnica de ARN de interferencia

Se considera que el mecanismo de ARN de interferencia (ARNi) ancestral funcionaba como mecanismo de defensa frente a virus (Waterhouse *et al.* 2001). Actualmente, este sistema parece haberse convertido en un componente esencial de los eucariotas multicelulares por su rol adicional en la regulación de la expresión de genes del desarrollo (Bernstein *et al.* 2003). Este mecanismo es utilizado en la actualidad para el silenciamiento específico de genes en una variedad de organismos. En triatominos, su eficiencia ha sido demostrada ampliamente en años recientes (Araujo *et al.* 2006, 2007, 2009; Mury *et al.* 2009; Paim *et al.* 2013; Defferrari *et al.* 2014; Blariza *et al.* 2017; Wulff *et al.* 2017, 2018; Dulbecco *et al.* 2018; Sierra 2018). Para conseguir un silenciamiento específico de genes mayor al 70% en estas especies, basta con inyectar 1 o más microgramos de ARN de doble cadena (ARNdc) en el hemocoele mediante una microjeringa. También se ha probado con éxito la administración oral, con el ARNdc disuelto en la sangre ingerida, aunque con una eficiencia mucho menor y más difícil de controlar experimentalmente (Araujo *et al.* 2006).

4.1.2.1 Mecanismo de acción del ARNi

El proceso de silenciamiento génico es disparado por la presencia de ARNdc complementario al gen que se desea silenciar (Fire *et al.* 1998). Cuando el ARNdc ingresa en la célula es clivado por la ARNasa *Dicer* en fragmentos de 21 a 25 nucleótidos, que se denominan ARNs de interferencia pequeños (siRNAs, del inglés *small interfering RNAs*) (Elbashir *et al.* 2001). Posteriormente, estos siRNAs se incorporan a un complejo

denominado RISC (del inglés *RNA-induced silencing complex*), del cual forma parte una proteína de la familia Argonauta que es la encargada de reconocer el ARNm específico y cortarlo (Hammond *et al.* 2001). El complejo es guiado al ARN mensajero (ARNm) específico y complementario a los siRNAs. Una vez localizado el ARNm por el complejo RISC se produce su degradación.

El efecto del ARNi puede ser autónomo, ambiental o sistémico. En el primer caso, se refiere al ARNi que afecta sólo a las células que lo generan o que están en contacto con el ARNdc introducido. El efecto sistémico ocurre cuando el ARNdc se esparce de célula a célula. El efecto ambiental ocurre cuando el organismo capta el ARNdc del ambiente y luego puede tener un esparcimiento sistémico (Whangbo & Hunter 2008).

4.1.2.2 ARN de interferencia como método de estudio de la función génica

La técnica de ARNi ofrece la posibilidad de estudiar la función de los genes en muchos organismos. Dado que el resultado de esta técnica es la disminución de la expresión de un gen de interés, es posible realizar inferencias mediante el estudio del fenotipo obtenido con la pérdida de función del gen. Por otra parte, la posibilidad de estudiar genes homólogos en diferentes especies facilita una mirada evolutiva (Bellés 2010).

En hemípteros, a diferencia de algunos lepidópteros y dípteros, la evidencia muestra que el silenciamiento génico por ARNi es eficiente, incluso en especies de plagas como *Bemisia tabaci*, *Acyrtosiphon pisum* y *Nilaparvata lugens* (Christiaens & Smagghe 2014). Esta técnica también se ha aplicado con éxito en triatominos, especialmente en *R. prolixus*, insecto en el que se ha demostrado que el ARNi perdura a largo plazo y puede transmitirse a la siguiente generación cuando se administra ARNdc a las hembras (Paim *et al.* 2013). Esto ha permitido estudiar la función de distintos genes en esta especie, como por ejemplo nitroporinas (Araujo *et al.* 2006, 2009), α -glucosidasa (Mury *et al.* 2009), fosfolipasa A2 (Defferrari *et al.* 2014), neuropéptidos orcokina (Wulff *et al.* 2017, 2018) y una GST (Sierra 2018). La técnica de ARNi también se ha utilizado con éxito en *T. infestans* para silenciar la expresión del gen de vitelogenina (Blariza *et al.* 2017) y varias enzimas CYPs (Dulbecco *et al.* 2018) y en *T. brasiliensis* para estudiar la función de un inhibidor de la trombina intestinal relacionado a la ingesta de sangre (Araujo *et al.* 2007).

4.1.2.3 Uso del ARNi como estrategia de control vectorial

La técnica de ARNi ha revolucionado el campo de la entomología aplicada al control de plagas, ya que ofrece la especificidad y flexibilidad que no es posible conseguir con el

uso de neurotóxicos. Las claves para una estrategia de control mediada por ARNi son la elección del gen a interferir y el modo de administración del ARNdc. El gen blanco debe ser esencial para la supervivencia o la reproducción. Además, debe tener una secuencia que se diferencie de otras especies que puedan estar expuestas al ARNdc para lograr un control específico de especie. Por ello las aproximaciones genómicas y transcriptómicas ofrecen información valiosa para la búsqueda de nuevos genes candidatos para el control de insectos (Scott *et al.* 2013). En cuanto al modo de administración, la producción y liberación de ARNdc a través de las plantas transgénicas en el caso de insectos fitófagos constituye una opción que ha mostrado ser eficiente para plagas de cultivos (Baum *et al.* 2007; Mao *et al.* 2007). Otras opciones son el uso de cebos o herramientas de rociado, tales como las utilizadas con los insecticidas convencionales, para la administración de ARNdc (Zhou *et al.* 2008; Hunter *et al.* 2010, 2012).

4.1.3 *R. prolixus* como modelo de estudio de la fisiología de insectos

El insecto *R. prolixus* ha sido utilizado como modelo de estudio en el campo de la fisiología de insectos desde hace casi un siglo. Los primeros estudios fueron llevados a cabo por Sir Vincent Wigglesworth, quien a lo largo de su carrera científica realizó estudios sobre el crecimiento, la muda y la reproducción en insectos (Wigglesworth 1934, 1939, 1953, 1954, 1959, 1964). La cría en laboratorio de este insecto posee una serie de ventajas con respecto a otras especies de triatomíneos: su ciclo de vida es corto, su desarrollo permanece detenido hasta el momento en que ocurre una ingesta de sangre y los procesos de desarrollo post-embrionario pueden predecirse con cierto grado de exactitud, lo que permite la planificación de los experimentos de forma precisa (Edwards 1998). Por otra parte, su tamaño en los últimos estadios del desarrollo permite realizar disecciones para el estudio de tejidos individuales. Además, es el único triatomíneo con información genómica disponible (Mesquita *et al.* 2015), lo que facilita la realización de estudios genéticos. Por último, *R. prolixus* es el triatomíneo que posee la mejor caracterización de su peptidoma hasta el momento (Ons 2017). Debido a las razones expuestas, este insecto ha sido elegido para llevar a cabo los experimentos descriptos en este capítulo.

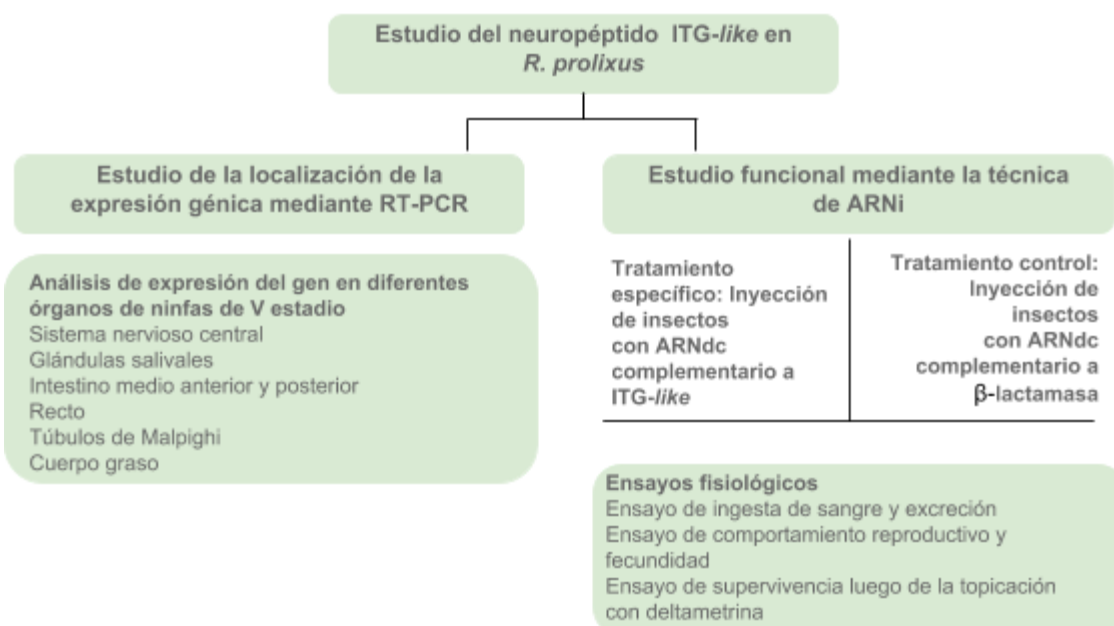
4.2 Hipótesis

El neuropéptido ITG-like está implicado en la detoxificación de deltametrina en *R. prolixus*.

4.3 Objetivos específicos

- Caracterizar el patrón de expresión del neuropéptido ITG-like en diferentes tejidos de ninfas de V estadio de *R. prolixus*.
- Explorar la implicación del neuropéptido ITG-like en procesos fisiológicos clave como alimentación, excreción, reproducción y desarrollo post-embrionario en *R. prolixus*.
- Estudiar la implicancia del neuropéptido ITG-like en la supervivencia de *R. prolixus* luego de la topicación con el insecticida piretroide deltametrina.

4.4 Resumen de la metodología utilizada

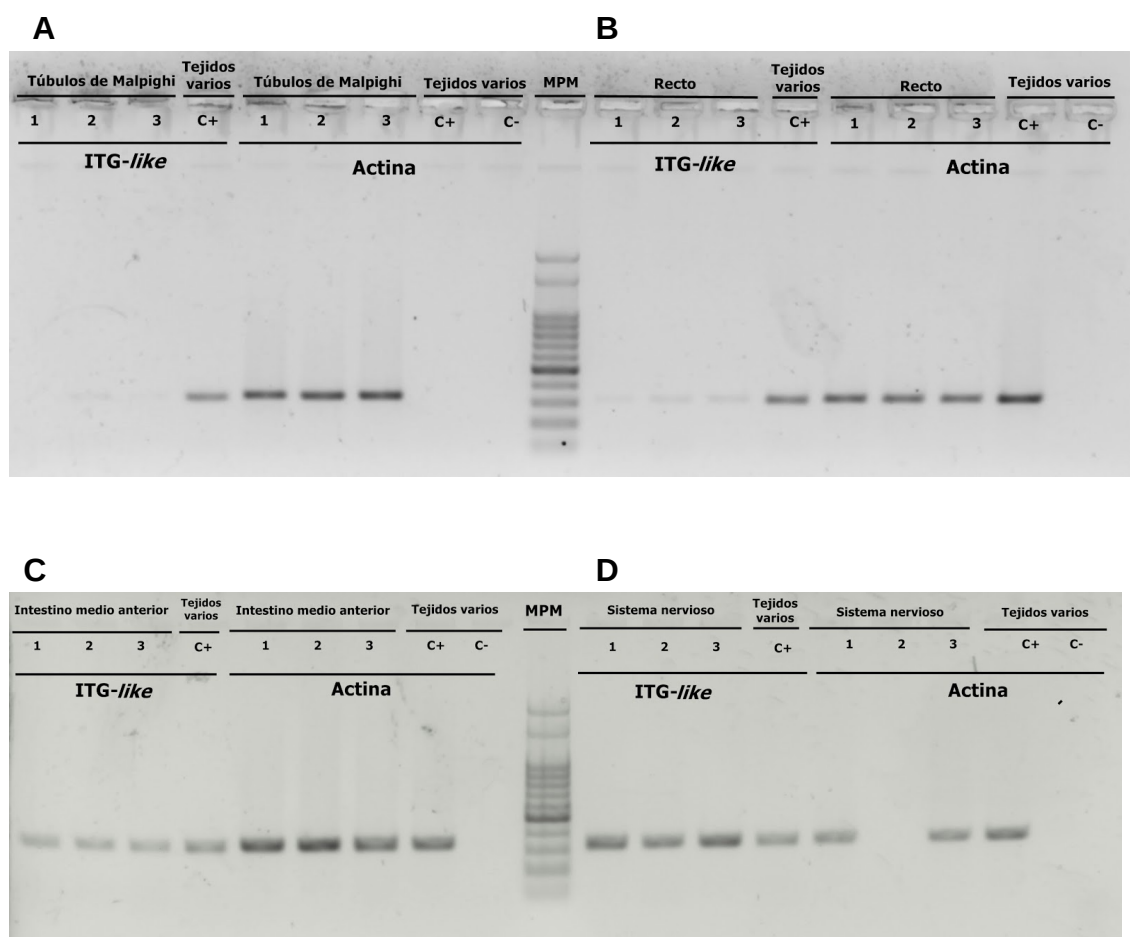


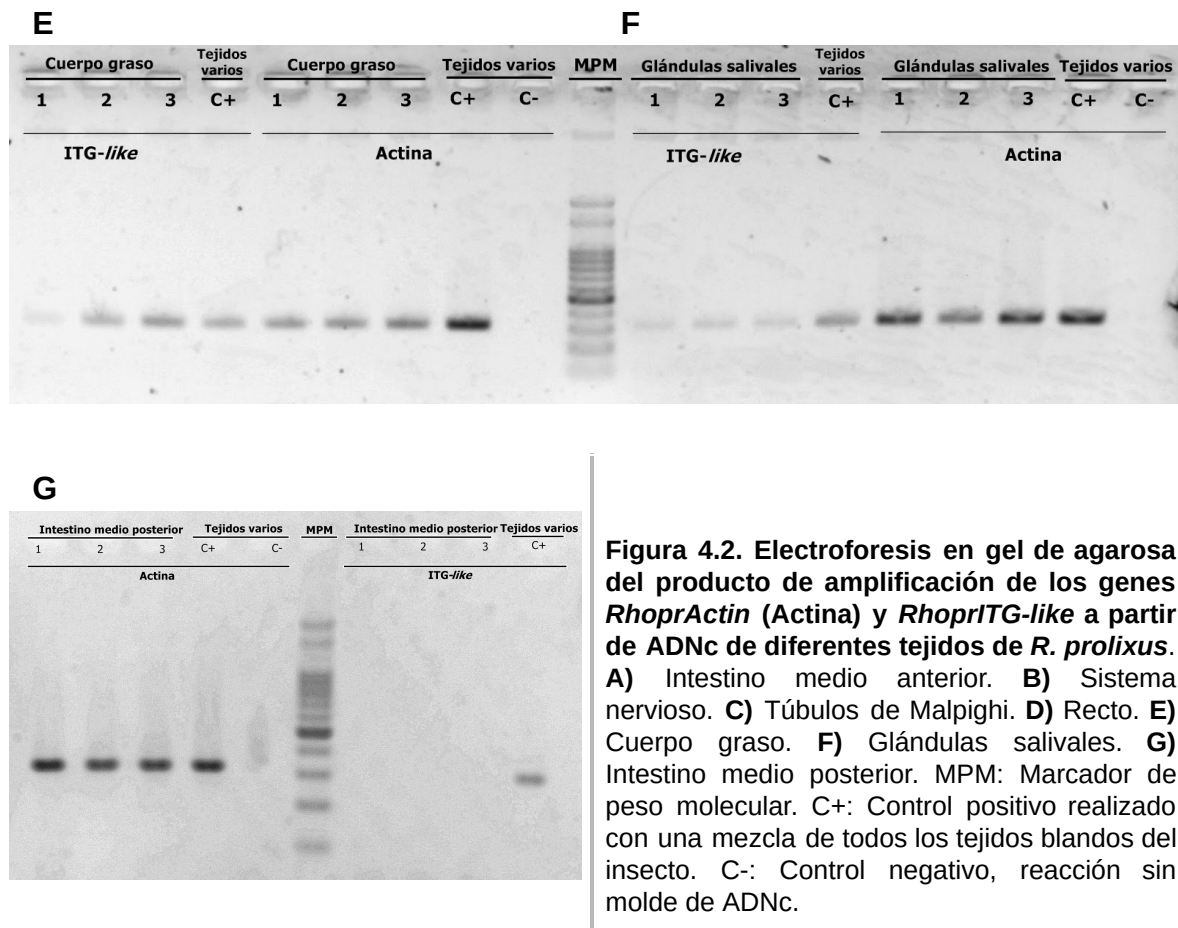
4.5 Resultados y discusión

4.5.1 Patrón de expresión del neuropéptido ITG-like en diferentes tejidos de *R. prolixus*

Se analizó la expresión de *RhoprITG-like* en diferentes tejidos procedentes de ninfas de V estadio a través de la técnica de RT-PCR. En todos los casos, se amplificó un fragmento del gen *RhoprActina* como control positivo de la reacción.

Los resultados indicaron que el precursor de *ITG-like* se expresa en el sistema nervioso, intestino medio anterior, recto, cuerpo graso y glándulas salivales, mientras que no se encontró expresión en intestino medio posterior y túbulos de Malpighi (Figura 4.2). La expresión observada difiere del patrón de expresión de la mayoría de los genes precursores de neuropéptidos, cuya expresión suele verse restringida al sistema nervioso central y en ciertos casos al intestino medio anterior (Ons 2017).





4.5.2 Rol del neuropéptido *RhoprITG-like* en funciones fisiológicas clave

4.5.2.1 Ingesta de sangre, excreción postprandial y muda

Se realizaron ensayos de silenciamiento génico de *RhoprITG-like* con el fin de determinar si el neuropéptido interviene en los procesos de ingesta de sangre, excreción postprandial y muda. Para esto se inyectaron 2 μ g de ARNdc de un fragmento de *RhoprITG-like* (dsITG) a ninfas ayunadas de V estadio de *R. prolixus* 5 a 7 días después de la muda. El grupo control fue inyectado con ARNdc inespecífico (codificante para el gen bacteriano β -lactamasa; ds β lac, ausente en el genoma de *R. prolixus*). Se inyectaron un total de 10 insectos por grupo. Como método de validación de la técnica de ARNi, se comprobó mediante qPCR que el tratamiento con dsITG provocó una disminución mayor al 80% en la abundancia del transcripto *RhoprITG-like* (Figura 4.7 A) en muestras tomadas 24hs después de la alimentación, en comparación con las inyectadas con ds β lac.

Pasados ocho días de la inyección de ARNdc, los insectos fueron marcados según su tratamiento con pintura acrílica de diferente color, pesados y finalmente alimentados durante 15 min. Los individuos de los grupos ds β lac y dsITG fueron alimentados conjuntamente en el mismo recipiente, a fin de evitar diferencias no debidas al tratamiento recibido. El peso de los insectos fue registrado inmediatamente después de la alimentación y posteriormente se registró el peso del volumen excretado a los 240 minutos. Se eligió este tiempo debido a que la diuresis post-prandial rápida dura entre 3 y 4 horas, tiempo en el que el insecto excreta alrededor del 50% del volumen ingerido (Coast 2009). No se detectó una diferencia significativa en el peso de la sangre ingerida (Figura 4.3 A), ni tampoco en el peso del volumen excretado entre ambos grupos (Figura 4.3 B). Por último, 5 insectos de cada grupo fueron monitoreados hasta el estadio adulto y no se observaron diferencias en los tiempos de la ecdisis.

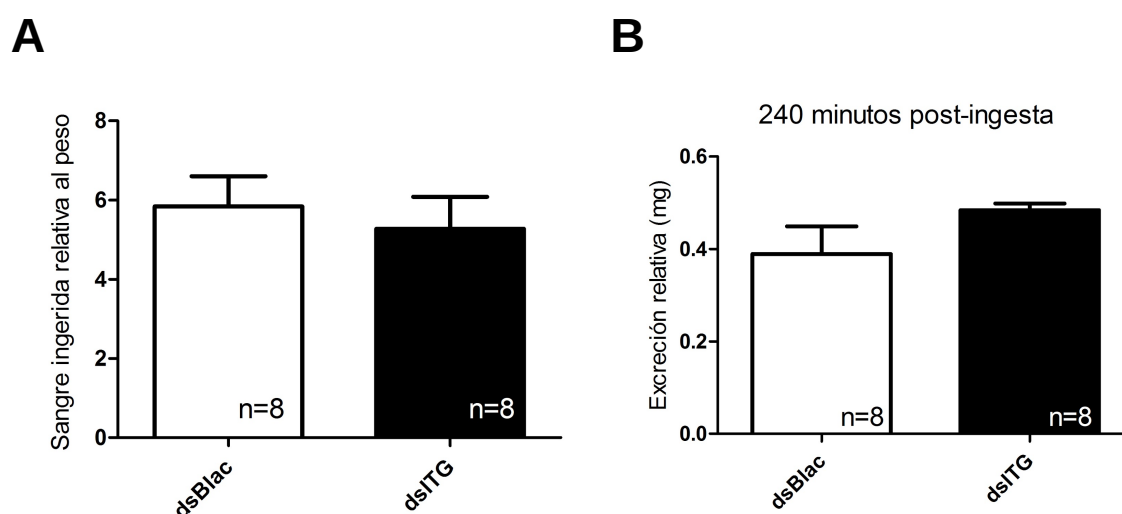


Figura 4.3. A) Cantidad relativa de sangre ingerida por los insectos tratados con dsITG y con ds β lac calculada según el peso del insecto antes y después de la ingesta de sangre. **B)** Volumen excretado por los insectos tratados con dsITG y con ds β lac pasados 240 minutos de la ingesta de sangre, calculado según el peso del volumen excretado por el individuo y el peso de la sangre ingerida. Las diferencias no fueron significativas.

4.5.2.2 Cópula y oviposición

Con el fin de evaluar la influencia del neuropéptido ITG-like en la reproducción de *R. prolixus*, se inyectaron 2 μ g de ARNdc de un fragmento de *RhoprITG-like* en hembras adultas vírgenes (separadas de machos en el estadio de ninfa V) de 1 a 4 días post-ecdisis. El grupo control fue inyectado con 2 μ g de ds β lac (N=8 por grupo). Doce días después de las

inyecciones se registró mediante qPCR una disminución en la expresión de *RhoprITG-like* del 99.4% (N=3; T-test; $p<0,05$) (Figura 4.7 B).

Una semana después de la inyección, las hembras y el mismo número de machos *wild-type* vírgenes se alimentaron a repleción por separado, registrándose su peso antes y después de la ingestión mediante una balanza de precisión. Transcurridos 5 días, los insectos se colocaron de a pares macho/hembra y se analizó el comportamiento de cópula. Para ello, se realizó un experimento en la oscuridad grabando a los insectos durante media hora con una cámara de video asistida por una luz infrarroja, conectada a una computadora ubicada en una habitación contigua (Figura 4.4 A). No se observaron diferencias en la cantidad de parejas que copularon ni en el tiempo hasta que ocurrió la cópula entre los grupos *dsβlac* y *dsITG* (N=7).

Se registró el número de huevos puestos por cada hembra luego de 75 días y se calculó el índice de fecundidad (Ruegg & Davey 1979, descrito en Materiales y métodos). No se observaron diferencias significativas entre los grupos (Figura 4.4 B).

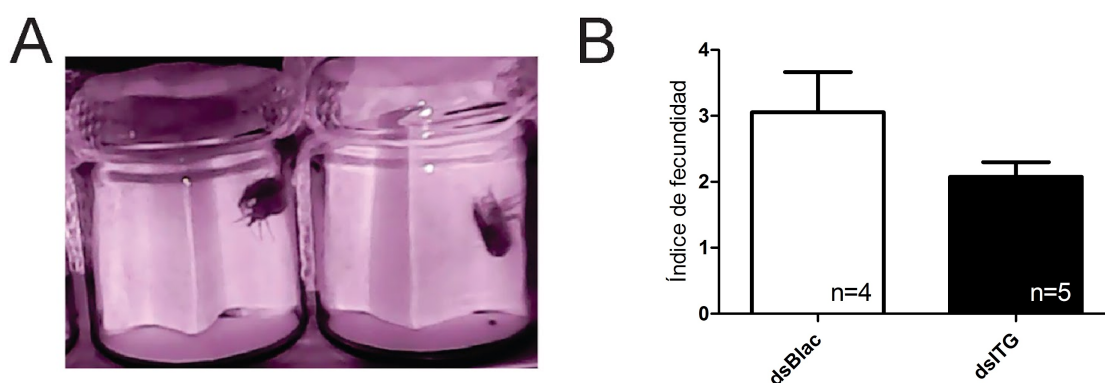


Figura 4.4. A) Dispositivo experimental utilizado para evaluar la cópula de insectos adultos de *R. prolixus*, observado a través de una cámara que graba en condiciones de oscuridad gracias a la iluminación con luz infrarroja. En cada frasco se observa un macho *wild-type* con una hembra interferida para *dsITG-like* (frasco izquierdo) o *dsβlac* (frasco derecho). **B)** Índice de fecundidad de las hembras *dsβlac* y *dsITG*, calculado según la cantidad de huevos ovipuestos por la hembra en relación a la sangre ingerida. Las diferencias no son significativas ($p=0,14$).

4.5.3 Rol de *ITG-like* en la supervivencia de *R. prolixus* tras la topicación con deltametrina

Las inyecciones de *dsITG* o *dsβlac* se realizaron a ninfas ayunadas de *R. prolixus* de V estadio de entre 7 y 10 días post-ecdysis. Nueve días después de las inyecciones se comprobó una disminución del 99,5% (N=3; T-test; $p<0,01$) en la abundancia de los

transcriptos del gen entre el grupo dsITG y el grupo dsβlac (Figura 4.7 C) (los insectos analizados habían sido topicados con acetona dos días antes, ver más adelante).

Siete días después de las inyecciones de ARNdc los insectos fueron topicados con 1 μl de deltametrina disuelta en acetona, en una concentración de 8,3 ng/μl (la DL_{50} para esa la población determinada por G. Mougabure Cueto, comunicación personal), o con 1 μl de acetona (grupo control). A las 8 horas post-topicación la supervivencia de los insectos del grupo dsITG fue del 40%, frente a un 68,7% de supervivencia en dsβlac. A las 24 horas post-topicación, la mortalidad fue de 96,4% para el grupo dsITG-like y de 75% en el grupo dsβlac. Las diferencias en la curva de mortalidad para los insectos topicados con deltametrina resultaron significativas ($p < 0,05$) según el análisis de Mantel-Cox (Figura 4.5). No se observaron diferencias significativas en las curvas de mortalidad de los insectos topicados con acetona (Figura 4.5).

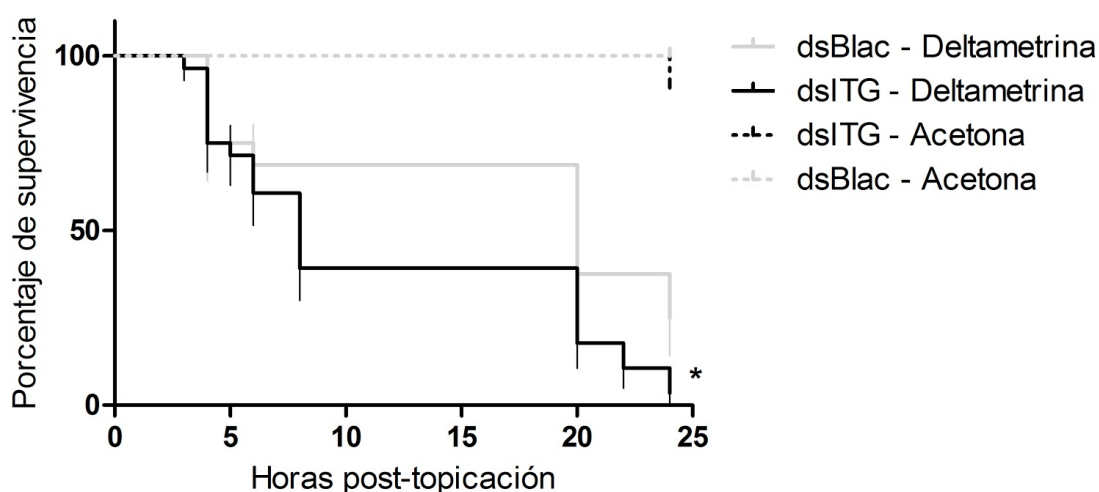


Figura 4.5. Comparación de las curvas de mortalidad de los insectos topicados con deltametrina (líneas continuas) o acetona (líneas punteadas), y tratados con dsITG (negro) o dsβlac (gris). Se muestra el porcentaje de supervivencia hasta las 24 hs. post-topicación con deltametrina. (Prueba de Mantel-Cox; *= diferencia significativa, $p=0,0323$)

Además de registrar la mortalidad se observaron parámetros que indican la intoxicación de los individuos: distensión abdominal, extensión de la probóscide y parálisis de patas (Alzogaray & Zerba 2016). Entre los insectos supervivientes luego de 8 horas de la topicación con deltametrina, el 20% de los insectos del grupo dsITG presentó distensión abdominal mientras que este síntoma no se observó en los controles (Figura 4.6 A). Un 50%

de los insectos tratados con ARNdc para *ITG-like* presentó extensión de la probóscide vs. un 25% de los controles; y un 25% de ambos grupos presentaron parálisis de patas (Figura 4.6 B).

Los resultados apuntan a una implicancia del neuropéptido *RhoprITG-like* en procesos detoxificativos o de supervivencia frente a la exposición de xenobióticos, mientras que la regulación de procesos fisiológicos tales como alimentación, excreción, desarrollo post-embrionario y reproducción no se vieron afectados por la disminución en la expresión del gen. La falta de efectos significativos del silenciamiento de *RhoprITG-like* en procesos sensibles al estado fisiológico del individuo sugiere que el resultado observado en la toxicidad frente a deltametrina podría deberse a un efecto específico en la detoxificación, y no a una disminución generalizada en el *fitness* de los insectos. Esto resulta coherente con nuestros resultados previos respecto a una sobre-expresión de *ITG-like* en *T. infestans* resistentes a piretroides (Traverso *et al.* 2016).

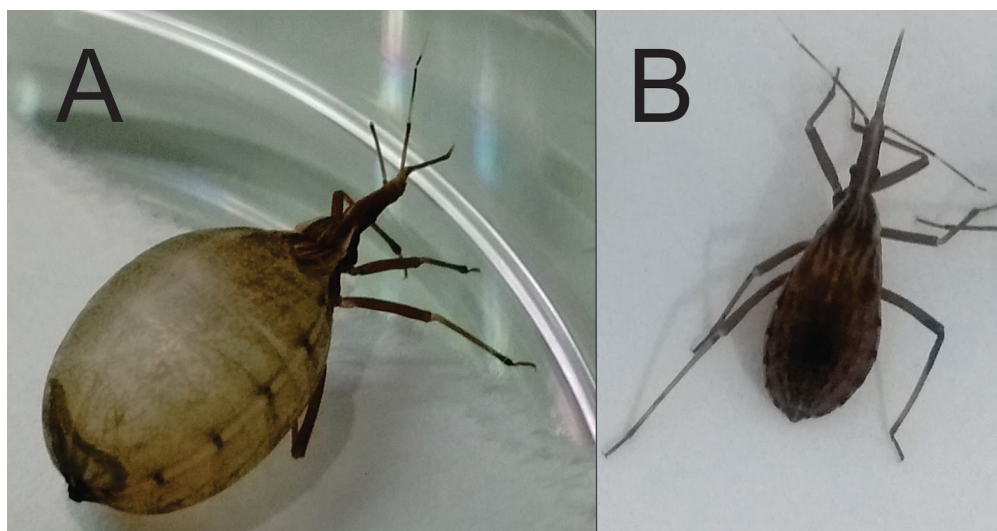


Figura 4.6. Insectos con síntomas de intoxicación con deltametrina. A) Distensión abdominal. **B)** Parálisis de patas y probóscide extendida.

Los mecanismos fisiológicos asociados al papel de *ITG-like* en la tolerancia a deltametrina son todavía desconocidos. Podría tener un papel protector frente al estrés oxidativo generado por el insecticida, tal como ocurre con el neuropéptido AKH (revisado en Kodric 2015). También podría activar mecanismos detoxificativos a través de la regulación de actividades enzimáticas u otros mecanismos. Serán necesarios nuevos experimentos para contrastar las hipótesis planteadas.

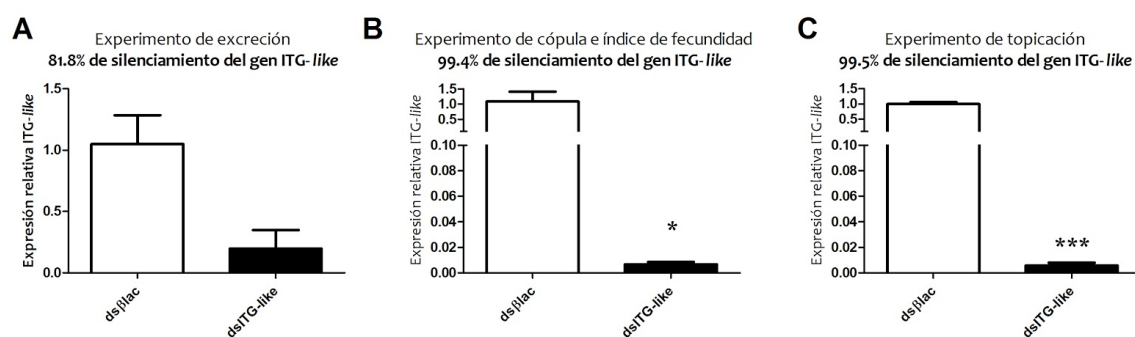


Figura 4.7. Disminución relativa en la abundancia del transcripto de *ITG-like* en los insectos tratados con dsITG-like y dsβlac, control. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante pruebas de T. *: $p < 0.05$; *: $p < 0.01$. **A**) Experimento de excreción (4.5.2.1). **B**) Experimento de cópula e índice de fecundidad (4.5.2.2). **C**) Experimento de topicación con deltametrina (4.5.3).**

4.5 Conclusiones

- *RhoprITG-like* está expresado en el sistema nervioso, intestino medio anterior, recto, cuerpo graso y glándulas salivales, lo que constituye un patrón de expresión particular respecto a otros genes precursores de neuropéptidos en la especie.
- Los resultados apuntan a un rol de neuropéptido *RhoprITG-like* en la respuesta frente a la intoxicación con deltametrina.
- *RhoprITG-like* no interviene en la regulación de los procesos de alimentación, excreción y ecdisis en ninfas de V estadio, ni en los procesos cópula y puesta de huevos.

Discusión general

El surgimiento de resistencia a insecticidas piretroides en *T. infestans* es probablemente una de las razones que han impedido la interrupción de la transmisión vectorial de *T. cruzi* en el Gran Chaco (Picollo *et al.* 2005; Gürtler 2009; Germano *et al.* 2012). El estudio de las causas de la resistencia tiene implicancias para el desarrollo de herramientas de control más eficientes, dado que el uso racional de insecticidas requiere un conocimiento extensivo sobre sus propiedades toxicológicas, la biología de los insectos y la interacción insecto-insecticida (Alzogaray & Zerba 2017). En consecuencia, en los últimos años diversos estudios han aportado conocimiento sobre el fenómeno de resistencia a piretroides en triatominos, permitiendo detectar poblaciones resistentes y analizar su distribución geográfica (Picollo *et al.* 2005; Santo Orihuela *et al.* 2008; Toloza *et al.* 2008; Lardeux *et al.* 2010; Germano *et al.* 2010, 2012, 2013a, b; Depickère *et al.* 2012; Roca-Acevedo *et al.* 2013; Gomez *et al.* 2014; Sierra *et al.* 2016; Fronza *et al.* 2016). En cuanto a los mecanismos subyacentes, se han descripto mutaciones *kdr* (Fabro *et al.* 2012; Capriotti *et al.* 2014; Sierra *et al.* 2016) y cambios en la cutícula de los insectos (Pedrini *et al.* 2009; Calderón-Fernández *et al.* 2017; Dulbecco *et al.* 2018) asociadas a resistencia. Sin embargo, y a pesar de que la detoxificación metabólica tiene un rol clave en el fenómeno de resistencia a insecticidas, sólo unos pocos estudios se han centrado en las enzimas involucradas en la detoxificación de xenobióticos en estos insectos (Gonzalez-Audino *et al.* 2004; Picollo *et al.* 2005; Santo Orihuela *et al.* 2008; Germano *et al.* 2012; Grosso *et al.* 2016; Traverso *et al.* 2017; Dulbecco *et al.* 2018). Dado que estas superfamilias son numerosas y variables entre especies, resulta indispensable conocer qué genes forman parte de estas superfamilias para poder estudiar su función. Además, el estudio estructural del complemento detoxificativo, y de las expansiones y reducciones de familias génicas, permitirán conocer el potencial de detoxificación de una determinada especie y elaborar hipótesis sobre la función de familias y superfamilias.

Las nuevas herramientas de secuenciación ofrecen una aproximación adecuada para estudiar los genes presentes en los organismos y su nivel de expresión de manera global. A diferencia de otras tecnologías, su gran ventaja es la capacidad de detectar secuencias desconocidas hasta el momento y de analizar un gran número de genes en tiempos acelerados (Wang *et al.* 2009; van Dijk *et al.* 2014). En este trabajo se plantea el uso de estas tecnologías y se presenta el primer análisis comparativo global del repertorio de superfamilias de enzimas detoxificativas de insectos triatominos. El hallazgo de características distintivas de esta subfamilia de insectos posibilita el planteo de nuevas hipótesis sobre su función en la detoxificación y el fenómeno de resistencia.

Hasta hoy, gran parte de lo que se conoce sobre el fenómeno de resistencia a insecticidas proviene del estudio de dípteros. Las diferencias halladas entre éstos y la subfamilia *Triatominae* podrían apuntar a una respuesta cualitativamente diferente frente a los tóxicos en estos insectos. A partir de la información de una gran cantidad de secuencias resultantes de este trabajo, será posible plantear nuevos estudios moleculares y fisiológicos que apunten a explorar de manera precisa la detoxificación en triatominos. Por otra parte, además del análisis cualitativo, aquí se presenta el primer estudio de la respuesta transcriptómica global a un insecticida en insectos triatominos. Los resultados revelan un posible rol de genes poco estudiados en triatominos en la respuesta a insecticidas y plantean nuevos posibles candidatos involucrados en el fenómeno de resistencia. Asimismo, algunos de estos genes tales como las OBPs y las proteasas ya han sido planteados como posibles nuevos blancos para el control de insectos (Zhou *et al.* 2010; Wilkins 2017), por lo que los resultados obtenidos en este trabajo ofrecen nuevos candidatos que podrían estudiarse como posibles vías de control vectorial.

El estudio de genomas y transcriptomas de insectos ha permitido conocer la secuencia completa de los precursores de neuropéptidos de varias especies, incluyendo aquellos que no habían sido identificados mediante la utilización de otras metodologías. Otro aporte novedoso de este trabajo es el uso de herramientas “ómicas” para estudiar el repertorio de neuropéptidos presente en los transcriptomas de *T. infestans*, *T. dimidiata* y *T. pallidipennis*, y poder comparar estas secuencias con las de *R. prolixus*, el único triatomino cuyo neuropeptidoma había sido estudiado en profundidad (Ons *et al.* 2010, 2016; Sterkel *et al.* 2011). Esta información resulta muy relevante en materia de investigación sobre vectores, ya que los neuropéptidos se han propuesto como un potencial blanco alternativo para el diseño de nuevos insecticidas por sus ventajas sobre los neurotóxicos en cuanto a especificidad y compatibilidad con el cuidado medioambiental (Verlinden *et al.* 2014; Audsley & Down 2015). La aproximación comparativa propuesta en este trabajo contribuye con información valiosa en cuanto a las características particulares de los neuropéptidos en esta subfamilia de insectos.

Algunos de los neuropéptidos descubiertos gracias a las nuevas tecnologías de secuenciación plantean una incógnita en cuanto a su función. Debido a su conservación a nivel de secuencia, podría pensarse que su rol en los organismos también se encuentra conservado. Uno de ellos es ITG-like, para el que previamente en nuestro grupo se había identificado una sobreexpresión en una población resistente de *T. infestans* (Traverso *et al.* 2016). Ese hallazgo constituyó la primer relación encontrada entre un neuropéptido y una población resistente a piretroides. Aquí se propuso estudiar la función de este gen a través

de la metodología de ARN de interferencia. Los resultados sugieren su implicación en la respuesta a deltametrina, siendo el primer reporte funcional para este neuropéptido en insectos y la primera aproximación que atribuye un rol detoxificativo a un neuropéptido.

Si bien la problemática de la persistencia en la transmisión de la enfermedad de Chagas es compleja y se encuentran involucrados factores logísticos, económicos, sociales y políticos (Gurtler *et al.* 2007; Gurtler 2009; Vazquez-Prokopec *et al.* 2009), el estudio de la biología de los vectores es imprescindible a la hora de diseñar estrategias de control. Este trabajo aporta información sobre el repertorio de genes clave en la respuesta a insecticidas en estos organismos y brinda datos novedosos sobre moléculas que podrían servir como blanco para el diseño de nuevos insecticidas.

A partir de los resultados se plantean una serie de candidatos interesantes a estudiar en cuanto a los procesos detoxificativos y al fenómeno de resistencia a insecticidas:

- Citocromos P450: familias exclusivas de triatomíneos (CYP3084-3093 y CYP3096), y CYPs organizados en *clusters* en *R. prolixus*.
- Enzimas expandidas dentro de la superfamilia de CCEs (clado E) y GSTs (clase Sigma).
- Genes diferencialmente expresados en los insectos tratados con deltametrina. El canal de sodio dependiente de voltaje y varios genes conservados en insectos, pero con función aún desconocida, serían genes candidatos, así como aquellos involucrados en procesos como: desarrollo post-embrionario, metabolismo, organización del citoesqueleto, transporte y señalización celular, estrés oxidativo, inmunidad, cutícula y sistema sensorial.

En cuanto al papel de ITG-like en la respuesta detoxificativa es interesante plantear futuros estudios en pos de conocer su mecanismo de acción:

- Analizar la implicancia de este neuropéptido en la respuesta al estrés desencadenada por diferentes factores abióticos.
- Explorar la existencia de una relación funcional entre el neuropéptido y enzimas detoxificativas.

En este trabajo se presenta el transcriptoma más completo hasta la fecha para *Triatoma infestans*, y resultados novedosos en cuanto al complemento detoxificativo y el neuropeptidoma en especies de triatominos. Además, se sugiere por primera vez la implicación de un neuropéptido en la detoxificación y en la resistencia a piretroides. En conjunto, hemos aplicado análisis genómicos, transcriptómicos, filogenéticos y moleculares para aportar a la comprensión de la detoxificación de xenobióticos y la resistencia a insecticidas en triatominos. El trabajo ha permitido una expansión significativa de las fronteras del conocimiento en este campo y posibilita el planteo de nuevas preguntas e hipótesis para proyectos futuros.

Anexo I:

Material Suplementario

Material Suplementario al Capítulo 1

Tabla S1.1

Clado CYP	Transcripto (RPRC-)	Intestino medio anterior	Cuerpo graso	Túbulos de Malpighi	Intestino medio posterior	Ovario	Recto	Testículos	Cuerpo entero
Mit.	003140	0	0	0	0	0	0	0	0
	006417	0	0	0	3	0	0	1	24
	014382	0	0	0	0	0	0	0	0
	001745	0	0	0	0	0	0	0	95
	006945	0	0	0	2	0	0	3	0
	009414	5	45	48	8	1	2	3	1075
	007082	1	0	0	1	0	1	0	10
CYP2	011595	0	0	0	1	0	0	1	24
	011241	0	0	0	0	0	1	0	2
	000592	0	0	0	0	0	1	0	0
	001301	0	0	0	0	0	5	0	5
	000513	0	0	0	0	0	0	0	0
	009370	0	0	0	0	0	0	0	0
	009377	0	0	0	0	1	0	3	0
	009372	0	0	0	0	0	0	0	2

Tabla S1.1. Expresión de los Citocromos P450 de los clados mitocondrial y CYP2 de *R. prolixus* (código de identificación de VectorBase) en los transcriptomas de diferentes tejidos del insecto, representada como número de lecturas mapeadas. Las bases de datos utilizadas fueron construidas por Oliveira *et al.* y están disponibles en <http://rhodnius.iq.ufrj.br>.

Tabla S1.2

Transcripto CYP3 (RPRC-)	Intestino medio anterior	Cuerpo graso	Túbulos de Malpighi	Intestino medio posterior	Ovario	Recto	Testículos	Cuerpo entero
009832	4	1	0	0	4	2	4	39
000320	13	0	0	0	25	25	24	60
014313	0	0	0	0	0	0	0	0
004305	0	0	0	2	1	0	0	12
007865	7	0	0	0	0	1	6	22
007864	7	0	0	0	0	1	6	22
000234	0	0	0	0	0	0	5	1
009032	11	0	0	1	15	25	6	62
010496	0	0	0	0	0	0	0	0
004913	0	0	0	0	0	0	0	0
004897	4	0	0	2	3	2	1	24
004888	31	0	0	2	26	7	9	69
000788	0	0	0	0	0	0	1	6

009053	0	0	0	0	0	0	0	0
001357	5	0	0	1	14	1	3	11
001358	5	0	0	1	14	1	3	11
008625	0	0	0	0	0	0	0	0
008750	0	0	0	0	0	0	0	0
000176	4	0	0	0	1	2	5	17
011591	0	0	0	0	0	0	0	0
007913	0	0	0	0	0	0	0	0
007197	0	0	0	0	0	0	0	0
000261	0	0	0	0	0	0	0	0
000358	10	2	0	9	5	13	5	26
004827	14	0	0	3	5	5	4	25
000005+01137 3	0	0	0	0	1	0	0	11
011368	0	0	0	0	1	0	0	11
000171	0	0	0	0	1	0	0	11
006625	0	0	0	1	8	12	0	23
013612	0	0	0	0	0	0	0	8
013598	0	0	0	1	1	1	0	0
005503	0	0	0	0	0	0	4	7
000046	0	0	0	0	0	0	4	7
013597	16	0	0	0	40	0	2	134
002146	3	0	0	5	4	0	14	44
000795	74	3	1	6	50	47	13	192
008405	74	3	1	6	50	47	13	192
013614	13	1	0	1	18	3	11	108
002590	4	0	0	1	3	1	1	9
013613	13	1	0	1	18	3	11	108
002592	4	0	0	1	3	1	1	9
002591	10	0	1	0	9	5	0	27
008431	10	0	1	0	9	5	0	27
014138	9	0	0	6	24	6	3	500
001678	0	0	0	0	0	1	0	1
014201	0	0	0	0	0	0	0	6
006536	0	0	0	0	0	0	0	6
011301	9	0	0	7	10	2	5	225
008835	0	0	0	0	0	0	0	0
014708	9	0	0	7	10	2	5	225
004242	0	0	0	0	0	1	0	6
011370	43	0	0	0	27	6	4	73
003089	43	0	0	0	27	6	4	73
006739	20	3	2	30	19	13	11	54
006697	20	3	2	30	19	13	11	54

Tabla S1.2. Expresión de los Citocromos P450 del clado CYP3 de *R. prolixus* (código de identificación de VectorBase) en los transcriptomas de diferentes tejidos del insecto, representada como número de lecturas mapeadas. Las bases de datos utilizadas fueron construidas por Oliveira *et al.* y están disponibles en <http://rhodnius.iq.ufrj.br>.

Tabla S1.3

Transcripto CYP4 (RPRC-)	Intestino medio anterior	Cuerpo graso	Túbulos de Malpighi	Intestino medio posterior	Ovario	Recto	Testículos	Cuerpo entero
004126	0	0	0	0	0	0	0	0
007284	0	0	0	0	0	0	0	0
013652	0	0	0	1	0	0	4	8
007300	0	0	0	0	0	0	0	0
007310	0	0	0	0	0	0	0	0
007309	0	0	0	0	3	0	0	22
007301	0	0	0	0	3	0	0	22
003226	3	0	0	0	0	0	0	2
009968	3	0	0	0	0	0	0	2
009967	5	0	0	0	2	0	0	23
005182	0	0	0	0	0	0	0	0
002131	0	0	0	0	0	0	0	0
005286	0	0	0	0	0	0	0	0
000277	8	0	0	0	10	50	2	104
003225	8	0	0	0	10	50	2	104
005184	0	0	0	0	0	0	2	4
005136	0	0	0	0	0	0	2	4
002132	0	0	0	0	0	0	2	4
013674	0	0	0	0	0	0	0	0
005323	0	0	0	0	0	0	17	7
007948	0	0	0	0	0	0	0	2
007953	0	0	0	0	0	0	0	0
007304	0	0	0	0	0	0	0	0
007947	0	0	0	0	0	0	0	0
000172	0	0	0	0	0	0	0	0
007299	0	0	0	0	0	0	1	7
008267	0	0	0	0	0	0	0	0
010477	1	0	0	0	0	0	2	6
007307	0	0	0	0	0	0	0	0
007950	0	0	0	0	0	0	0	0
007949	0	0	0	0	0	0	0	0
007305	1	0	0	0	0	0	2	6
007952	1	0	0	0	0	0	2	6
002481	1	0	0	0	0	0	2	6

005934	0	0	0	0	0	0	0	0
003227	8	0	0	1	16	3	6	77
013847	0	0	0	0	0	0	2	0
000027	13	2	0	0	15	20	12	27
002974	0	0	0	0	0	1	0	23
015287	39	2	0	8	13	43	3	19
015286	39	2	0	8	13	43	3	19
009721	0	0	0	0	0	0	13	23
004758	2	2	0	2	4	0	3	22
000196	0	0	0	0	3	0	0	0
004766	20	0	0	6	6	9	7	61
004736	0	0	0	0	0	0	0	4
004733	0	0	0	1	0	0	1	1
004731	8	0	0	4	2	1	3	37
004769	7	1	0	0	2	1	13	30

Tabla S1.3. Expresión de los Citocromos P450 del clado CYP4 de *R. prolixus* (código de identificación de VectorBase) en los transcriptomas de diferentes tejidos del insecto, representada como número de lecturas mapeadas. Las bases de datos utilizadas fueron construidas por Oliveira *et al.* y están disponibles en <http://rhodnius.iq.ufrj.br>.

Tabla S1.4

Clado CCE	Transcripto (RPRC-)	Intestino medio anterior	Cuerpo graso	Túbulos de Malpighi	Intestino medio posterior	Ovario	Recto	Testículos	Cuerpo entero
E	003620	2	0	0	0	0	0	0	14
	012523	0	0	0	6	0	1	0	1
	003619	0	0	0	0	0	0	3	3
	003578	2	0	0	0	0	0	0	14
	003733	0	0	0	0	0	0	0	0
	003093	3	0	0	1	0	0	1	4
	007919	8	0	0	4	3	2	4	20
	007965	8	0	0	4	3	2	4	20
	003806	3	0	0	1	0	0	4	3
	003808	3	0	0	1	0	0	4	3
	001592	0	0	0	0	0	0	0	0
	007702	0	0	0	0	0	0	0	0
	007698	4	0	0	0	2	0	0	13
	007700	0	0	0	0	0	0	0	0
	007696	4	0	0	0	2	0	0	13
	008235	14	0	0	2	24	15	16	108
	008217	14	0	0	2	24	15	16	108
	003566	2	0	0	3	1	0	8	13
	003606	0	0	0	0	0	0	0	0

	003565	1	0	0	0	0	1	0	1
	003564	0	0	0	0	0	0	0	3
	003605	0	0	0	0	0	0	0	0
	010263	0	0	0	0	0	0	0	0
	010261	0	0	0	0	0	0	0	0
	010262	0	0	0	0	0	0	0	0
	001239	0	0	0	0	7	6	0	5
	010259	0	0	0	0	0	0	0	0
	010260	0	0	0	0	0	0	0	0
	004681	0	0	0	0	7	6	0	5
	010265	0	0	0	0	7	6	0	5
	004680	0	0	0	0	0	0	0	0
	010267	0	0	0	0	0	0	7	26
	010224	0	0	0	0	0	4	0	0
	010268	4	2	23	1	5	6	8	85
	010226	4	2	23	1	5	6	8	85
	014627	0	0	0	0	0	0	0	3
	010228	0	0	0	0	0	0	0	3
	010231	0	0	0	0	0	0	0	3
	014625	0	0	0	0	0	0	0	3
	014623	0	0	0	0	0	0	0	3
H	007352	37	1	2	1	57	44	10	194
	002814	0	0	0	0	0	0	0	2
I	005626	0	0	0	0	0	0	0	0
J	000482	0	0	1	0	0	0	0	79
	003013	0	0	0	0	0	0	0	0
K	005115	0	0	0	0	0	0	0	0
L	001512	0	0	0	0	0	0	0	0
	006234	0	0	0	0	0	0	0	0
	000840	0	0	0	0	0	0	0	0
	001231	0	0	0	0	0	0	0	0
	007770	0	0	0	0	0	0	0	0
	012978	0	0	0	0	0	0	0	0
	006235	0	0	0	0	0	0	0	0
	013129	0	0	0	0	0	0	195	30
	001403	0	0	0	0	0	0	0	0
	001513	0	0	0	0	0	0	0	0
	002570	0	0	0	0	0	0	0	0
	006236	0	0	0	0	0	0	0	0
	012977	0	0	0	0	0	0	0	0
M	000721	0	0	0	0	0	0	0	0
	013515	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla S1.4. Expresión de CCEs de *R. prolixus* (código de identificación de VectorBase) en los transcriptomas de diferentes tejidos del insecto, representada como número de lecturas mapeadas. Las bases de datos utilizadas fueron construidas por Oliveira *et al.* y están disponibles en <http://rhodnius.iq.ufrj.br>.

Tabla S1.5

Clase	Transcripto	Intestino medio anterior	Cuerpo graso	Túbulos de Malpighi	Intestino medio posterior	Ovario	Recto	Testículos	Cuerpo entero
Delta	RPRC013179	0	0	0	0	0	2	0	11
Omega	RPRC007741	21	0	0	0	11	11	8	2
Sigma	RPRC002917	1	0	0	0	0	0	4	2
	RPRC007353	181	0	0	0	180	166	35	83
	RPRC009365	5	0	0	4	15	1	2	24
	RPRC010609	4	0	0	2	5	8	2	9
	RPRC011128	0	0	0	0	0	0	0	0
	RPRC011244	1	26	7	0	10	7	1	25
Theta	RPRC015269	2	0	0	0	0	0	0	2
	RPRC009138	157	0	2	0	121	32	11	49
	RPRC009358	157	0	2	0	121	32	11	49
Zeta	RPRC009617	52	0	1	3	29	40	14	162
	RPRC014626	1	0	0	0	0	0	0	7
Microsomal	RPRC001773	1	0	0	0	5	3	4	102

Tabla S1.5. Expresión de GSTs de *R. prolixus* (código de identificación de VectorBase) en los transcriptomas de diferentes tejidos del insecto, representada como número de lecturas mapeadas. Las bases de datos utilizadas fueron construidas por Oliveira *et al.* y están disponibles en <http://rhodnius.iq.ufrj.br>.

Material Suplementario al Capítulo 3

Tabla S3.1

	1		2		3		4	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Estadísticas básicas	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
Calidad de secuencias por base	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
Puntuación de calidad por secuencia	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
Contenido de secuencia por base	X	X	X	X	X	X	X	X
Contenido de GC por base	X	X	X	X	X	X	X	X
Contenido de GC por secuencia	!	!	OK	OK	!	OK	!	!
Contenido de N por base	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
Distribución de la longitud de las secuencias	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
Niveles de duplicación de secuencias	X	X	X	X	X	X	X	X
Secuencias sobrerrepresentadas	!	!	!	!	!	!	!	!
Contenido de <i>Kmers</i>	!	!	!	!	!	!	!	!

Tabla S3.1. Resumen del resultado del análisis de calidad de secuenciación de las muestras 1 a 4, realizado con el software FASTQC versión 0.10.1. Los símbolos en las celdas indican el resultado de la prueba: OK = pasó, X = falló, ! = pasó con advertencia.

Tabla S3.2

	5		6		7		8	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Estadísticas básicas	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
Calidad de secuencia por base	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
Puntuación de calidad por secuencia	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
Contenido de secuencia por base	X	X	X	X	X	X	X	X
Contenido de GC por base	X	X	X	X	X	X	X	X
Contenido de GC por secuencia	!	!	!	!	OK	!	!	!
Contenido de N por base	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
Distribución de la longitud de las secuencias	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
Niveles de duplicación de secuencias	X	X	X	X	X	X	X	X
Secuencias sobrerrepresentadas	!	!	!	!	!	!	!	!
Contenido de <i>Kmers</i>	!	!	!	!	!	X	!	!

Tabla S3.2. Resumen del resultado del análisis de calidad de secuenciación de las muestras 5 a 8, realizado con el software FASTQC versión 0.10.1. Los símbolos en las celdas indican el resultado de la prueba: OK = pasó, X = falló, ! = pasó con advertencia.

Tabla S3.3

Transcripto sobreexpresado	Mejor hit vs. <i>D. melanogaster</i>	Mejor hit vs. <i>R. prolixus</i>	Mejor hit vs. NCBI
TRINITY_DN35400_c0_g1_i1	FBpp0078759	RPRC005164-PA	ubiquinone biosynthesis monooxygenase COQ6, mitochondrial [Halyomorpha halys]
TRINITY_DN35926_c3_g1_i4	.	RPRC004267-PA	putative odorant-binding protein [Triatoma brasiliensis]
TRINITY_DN35940_c10_g1_i1	FBpp0293792	RPRC000750-PA	beta-arrestin-1 isoform X2 [Cimex lectularius]

TRINITY_DN359 55_c6_g1_i8	FBpp0112137	RPRC01065 8-PA	xaa-Pro aminopeptidase 1-like [Halyomorpha halys]
TRINITY_DN364 56_c7_g3_i4	FBpp0308356	RPRC01426 6-PA	RUN and FYVE domain-containing protein 2-like Protein [Tribolium castaneum]
TRINITY_DN372 02_c6_g1_i6	.	RPRC00702 8-PA	uncharacterized protein LOC106669406 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN379 70_c2_g2_i4	FBpp0305840	RPRC00166 8-PA	histone-arginine methyltransferase CARMER isoform X1 [Halyomorpha halys]
TRINITY_DN382 09_c4_g1_i8	.	RPRC00956 3-PA	RING finger protein 207-like isoform X2 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN384 20_c3_g1_i4	FBpp0288962	RPRC01428 2-PA	deoxynucleotidyltransferase terminal-interacting protein 1 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN386 54_c2_g1_i2	FBpp0086818	RPRC00444 0-PA	cholinephosphotransferase 1 isoform X6 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN387 99_c3_g1_i4	FBpp0308974	RPRC01062 4-PA	secreted Mys2-like protein [Pristhesancus plagipennis]
TRINITY_DN389 09_c2_g1_i7.p2	FBpp0078327	RPRC00573 8-PA	m7GpppX diphosphatase [Halyomorpha halys]
TRINITY_DN389 55_c7_g1_i2	FBpp0297547	RPRC00186 4-PA	protein lethal(2) giant larvae isoform X1 [Halyomorpha halys]
TRINITY_DN391 48_c2_g3_i7	FBpp0083227	RPRC00404 2-PA	short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial isoform X1 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN395 12_c0_g1_i1	FBpp0079915	RPRC01072 5-PA	threonine--tRNA ligase, cytoplasmic isoform X2 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN395 79_c4_g1_i9	FBpp0071937	RPRC01010 3-PA	myotubularin-related protein 8 isoform X4 [Zootermopsis nevadensis]
TRINITY_DN396 86_c5_g2_i13	FBpp0305289	RPRC01123 6-PA	nucleolar protein NHP2 [Culex quinquefasciatus]
TRINITY_DN397 11_c2_g2_i4	FBpp0112271	RPRC01074 6-PA	endocuticle structural glycoprotein SgAbd-3-like [Cimex lectularius]
TRINITY_DN397 12_c1_g1_i5	FBpp0077149	RPRC01108 5-PA	protein YIPF6 isoform X1 [Harpegnathos saltator]
TRINITY_DN397 36_c3_g1_i7.p3	FBpp0089338	RPRC01174 2-PA	14-3-3 protein zeta isoform X2 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN397 57_c13_g1_i14	FBpp0086024	RPRC01306 6-PA	syndetin [Halyomorpha halys]
TRINITY_DN398 31_c10_g1_i2	FBpp0085060	RPRC00279 5-PA	leukocyte elastase inhibitor-like [Cimex lectularius]
TRINITY_DN399 45_c12_g1_i13	FBpp0072448	RPRC01345 0-PA	zinc finger protein 836-like [Halyomorpha halys]
TRINITY_DN401 78_c0_g1_i17	FBpp0302680	.	protein Gawky isoform X2 [Halyomorpha halys]
TRINITY_DN401 99_c6_g1_i7	.	RPRC01244 1-PA	secreted Juvenile hormone-like protein [Pristhesancus plagipennis]
TRINITY_DN402 55_c16_g1_i5	FBpp0070418	RPRC00103 1-PA	cyclin-L1 isoform X1 [Cimex lectularius]

TRINITY_DN40366_c8_g1_i13	FBpp0308797	RPRC008049-PA	diphthine--ammonia ligase [Cimex lectularius]
TRINITY_DN40371_c4_g1_i11	FBpp0073043	RPRC011050-PA	phosphatase and actin regulator 2 isoform X2 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN40387_c3_g1_i3	FBpp0072568	RPRC002386-PA	myosin-IB isoform X1 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN40431_c8_g1_i3	FBpp0312179	RPRC013835-PA	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex assembly factor 2 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN40969_c4_g2_i5	FBpp0311927	RPRC009923-PA	cyclic AMP-responsive element-binding protein 1 isoform X4 [Halyomorpha halys]
TRINITY_DN40969_c4_g2_i7	FBpp0302023	RPRC009923-PA	cyclic AMP response element-binding protein B isoform X3 [Galleria mellonella]
TRINITY_DN41038_c2_g1_i6	.	RPRC005873-PA	protein FAM214A [Cimex lectularius]
TRINITY_DN41336_c7_g1_i4	FBpp0309407	RPRC008068-PA	secreted Twisted gastrulation-like protein [Pristhesancus plagipennis]
TRINITY_DN41686_c0_g1_i7	FBpp0078425	RPRC007342-PA	MMS19 nucleotide excision repair protein homolog [Cimex lectularius]
TRINITY_DN41776_c12_g1_i5	FBpp0070620	RPRC007588-PA	pyruvate dehydrogenase phosphatase regulatory subunit, mitochondrial isoform X1 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN42029_c4_g1_i6	FBpp0078642	RPRC011862-PA	PREDICTED: collagen alpha-1(IX) chain-like isoform X1 [Aethina tumida]
TRINITY_DN42100_c5_g1_i2	FBpp0304776	RPRC011617-PA	cingulin isoform X3 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN42104_c2_g2_i4	FBpp0087781	RPRC009774-PA	long chain acyl-CoA synthetase isoform 2 [Rhodnius prolixus]
TRINITY_DN42356_c1_g1_i17	FBpp0085812	RPRC003383-PA	kelch-like protein 17 isoform X8 [Halyomorpha halys]
TRINITY_DN42484_c2_g1_i8	FBpp0088313	RPRC001527-PA	transcription elongation factor S-II-like isoform X2 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN42671_c4_g1_i4	FBpp0075260	RPRC007784-PA	kelch-like protein diablo [Cimex lectularius]
TRINITY_DN42755_c7_g1_i1	FBpp0301733	RPRC001510-PA	Krueppel-like factor 3 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN43112_c11_g1_i5	FBpp0307962	RPRC003202-PA	N-acetyltransferase 9-like protein [Cimex lectularius]
TRINITY_DN43346_c2_g1_i1	FBpp0080735	.	protein pigeon [Cimex lectularius]
TRINITY_DN43398_c5_g1_i1	.	.	reverse transcriptase, partial [Bacillus rossius]
TRINITY_DN43406_c3_g5_i2	FBpp0296971	RPRC012982-PA	uncharacterized protein LOC106665486 isoform X2 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN43419_c5_g1_i6	FBpp0311938	RPRC010301-PA	sodium-independent sulfate anion transporter-like [Cimex lectularius]
TRINITY_DN43628_c10_g1_i4	FBpp0087731	RPRC009287-PA	WD repeat-containing protein 43 [Cimex lectularius]

TRINITY_DN436 82_c5_g1_i11	FBpp0303309	RPRC00906 7-PA	protein couch potato isoform X5 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN438 44_c3_g3_i1	FBpp0292717	RPRC00256 3-PA	sodium channel protein para isoform X10 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN439 78_c15_g1_i8	FBpp0309617	RPRC00822 0-PA	monocarboxylate transporter 9-like isoform X1 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN441 22_c1_g1_i1	FBpp0309528	RPRC00997 9-PA	unkown protein [Riptortus pedestris]
TRINITY_DN441 22_c1_g1_i2	FBpp0309528	RPRC00997 9-PA	unkown protein [Riptortus pedestris]
TRINITY_DN444 69_c3_g1_i10	FBpp0309123	RPRC01051 5-PA	integrin beta-PS isoform X2 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN444 95_c1_g1_i6	FBpp0078642	RPRC00316 5-PA	collagen alpha-1(V) chain-like [Rhopalosiphum maidis]
TRINITY_DN446 75_c0_g1_i12	FBpp0310374	RPRC00832 1-PA	uncharacterized protein LOC106677853 [Halyomorpha halys]
TRINITY_DN449 38_c2_g3_i7	FBpp0310390	RPRC01542 0-PA	apolipoprotein D-like [Cimex lectularius]
TRINITY_DN451 48_c2_g1_i6	FBpp0309999	RPRC01328 0-PA	putative chemosensory protein [Triatoma brasiliensis]
TRINITY_DN452 20_c2_g1_i12	FBpp0110333	RPRC00266 6-PA	MAGUK p55 subfamily member 5 isoform X2 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN452 51_c8_g1_i2	FBpp0083688	RPRC00971 8-PA	uncharacterized protein LOC106661511 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN453 92_c1_g1_i5	FBpp0304430	RPRC01228 5-PA	titin isoform X1 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN454 44_c1_g1_i3	FBpp0081754	RPRC00699 8-PA	RNA-binding protein [Riptortus pedestris]
TRINITY_DN455 12_c10_g1_i4	.	RPRC00013 1-PA	secreted hypothetical protein [Pristhesancus plagipennis]
TRINITY_DN455 67_c8_g1_i6	FBpp0081881	RPRC01467 0-PA	sodium-coupled monocarboxylate transporter 2-like isoform X2 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN455 77_c5_g1_i2	FBpp0290667	RPRC01287 9-PA	sodium/hydrogen exchanger 8 isoform X2 [Halyomorpha halys]
TRINITY_DN456 42_c0_g1_i5	FBpp0309192	RPRC01387 2-PA	endoribonuclease Dicer isoform X2 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN456 73_c9_g1_i6	FBpp0100129	RPRC01023 3-PA	rab11 family-interacting protein 4B-like isoform X5 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN458 65_c4_g2_i1	.	RPRC01075 6-PA	serine/arginine repetitive matrix protein 1 isoform X1 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN459 96_c0_g1_i2	FBpp0288910	RPRC00205 1-PA	probable 3',5'-cyclic phosphodiesterase pde-1 isoform X2 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN460 98_c3_g1_i12	.	RPRC00560 0-PA	polyprotein [Blattella germanica]
TRINITY_DN462 98_c1_g1_i12	FBpp0303864	RPRC00310 4-PA	transmembrane protein 94 isoform X3 [Cimex lectularius]

TRINITY_DN465 65_c4_g4_i1	FBpp0309242	RPRC00270 3-PA	N-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol biosynthetic protein [Cimex lectularius]
TRINITY_DN470 87_c7_g2_i3	FBpp0311236	RPRC00015 0-PA	uncharacterized protein LOC106674111 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN345 37_c0_g1_i1	.	.	uncharacterized protein LOC113468745 [Diaphorina citri]
TRINITY_DN365 67_c0_g1_i4	FBpp0310926	RPRC00992 9-PA	RNA polymerase II second largest subunit [Anacanthocoris stricornis]
TRINITY_DN469 08_c4_g3_i3	.	RPRC00681 4-PA	PREDICTED: uncharacterized protein LOC108773916 [Cyphomyrmex costatus]
Tabla S3.3. Transcritos sobreexpresados con anotaciones coincidentes en <i>blastx</i> y <i>blastp</i> vs. NCBI (nr; insectos), y sus correspondientes coincidencias obtenidas en las búsquedas vs. las proteínas de <i>D. melanogaster</i> y <i>R. prolixus</i> . El punto representa la ausencia de coincidencia.			

Tabla S3.4

Transcripto subexpresado	Mejor hit vs. <i>D. melanogaster</i>	Mejor hit vs. <i>R. prolixus</i>	Mejor hit vs. NCBI
TRINITY_DN308 70_c0_g1_i1	FBpp0079133	RPRC006447 -PA	Murinoglobulin-1 [Cryptotermes secundus]
TRINITY_DN333 88_c0_g1_i1	FBpp0088926	RPRC012101 -PA	PREDICTED: S-adenosylmethionine synthase isoform X1 [Habropoda laboriosa]
TRINITY_DN355 66_c4_g1_i3	FBpp0307459	RPRC012094 -PA	atrial natriuretic peptide-converting enzyme isoform X2 [Halyomorpha halys]
TRINITY_DN355 66_c4_g1_i7	FBpp0307459	RPRC012094 -PA	atrial natriuretic peptide-converting enzyme isoform X2 [Halyomorpha halys]
TRINITY_DN356 77_c10_g1_i1	FBpp0074381	RPRC000513 -PA	cytochrome P450 18a1 [Orussus abietinus]
TRINITY_DN362 92_c4_g4_i4	FBpp0075698	RPRC012861 -PA	melanotransferrin [Halyomorpha halys]
TRINITY_DN362 92_c4_g9_i2	FBpp0079134	RPRC006447 -PA	PREDICTED: pregnancy zone protein-like [Neodiprion lecontei]
TRINITY_DN363 59_c8_g2_i4	FBpp0307419	RPRC001574 -PA	cytosolic carboxypeptidase-like protein 5 isoform X5 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN364 25_c14_g1_i4	FBpp0310621	RPRC013525 -PA	Golgi to ER traffic protein 4 homolog [Cimex lectularius]
TRINITY_DN364 96_c0_g2_i1	FBpp0082004	RPRC003347 -PA	myotubularin-related protein 13 isoform X2 [Halyomorpha halys]
TRINITY_DN372 38_c0_g1_i3	FBpp0081828	RPRC006049 -PA	protein arginine methyltransferase NDUFAF7, mitochondrial isoform X1 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN372 46_c3_g1_i5	FBpp0071592	RPRC003930 -PA	cyclic nucleotide-gated cation channel beta-1 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN374 16_c5_g1_i7	FBpp0302998	RPRC005533 -PA	rho guanine nucleotide exchange factor 18 isoform X3 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN380 82_c13_g1_i4	FBpp0081733	RPRC000587 -PA	homeobox protein homothorax isoform X2 [Cimex lectularius]

TRINITY_DN38209_c4_g1_i2	.	RPRC009563-PA	RING finger protein 207-like isoform X2 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN38760_c2_g2_i4	FBpp0292244	RPRC013282-PA	ankyrin-3-like isoform X5 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN39361_c7_g1_i2	FBpp0085074	RPRC002974-PA	cytochrome P450 4C1-like isoform X1 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN39600_c10_g1_i1	FBpp0297518	RPRC007678-PA	tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 4 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN39667_c2_g1_i2	FBpp0086817	RPRC009724-PA	SH2 domain-containing protein 4B isoform X2 [Halyomorpha halys]
TRINITY_DN39680_c1_g1_i4	FBpp0072768	RPRC005074-PA	nucleolar MIF4G domain-containing protein 1 homolog [Cimex lectularius]
TRINITY_DN39945_c12_g1_i14	FBpp0072448	RPRC013450-PA	zinc finger protein 836-like [Halyomorpha halys]
TRINITY_DN40181_c4_g1_i2	FBpp0290451	RPRC009175-PA	gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-6-like isoform X1 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN40426_c1_g2_i2	FBpp0308426	RPRC000473-PA	serotonin receptor type 2B [Rhodnius prolixus]
TRINITY_DN40431_c8_g1_i5	FBpp0297164	RPRC013924-PA	beta-mannosidase isoform X1 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN40470_c6_g1_i3	FBpp0073659	RPRC011923-PA	nuclear pore complex protein Nup93-like [Cimex lectularius]
TRINITY_DN40476_c6_g1_i1	FBpp0078372	RPRC005081-PA	sympleskin [Cimex lectularius]
TRINITY_DN40486_c1_g1_i2	FBpp0306021	RPRC014784-PA	FH1/FH2 domain-containing protein 3 isoform X1 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN40602_c5_g1_i3	FBpp0303937	RPRC011290-PA	aldose reductase [Halyomorpha halys]
TRINITY_DN40850_c0_g1_i5	FBpp0082329	.	origin recognition complex subunit 2 isoform X2 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN41017_c4_g1_i2	FBpp0071071	RPRC012740-PA	17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 13-like [Halyomorpha halys]
TRINITY_DN41306_c3_g1_i14	FBpp0291051	RPRC003187-PA	papilin isoform X2 [Halyomorpha halys]
TRINITY_DN41416_c1_g1_i3	FBpp0070175	RPRC003485-PA	cell division control protein 45 homolog [Cimex lectularius]
TRINITY_DN41470_c6_g1_i2	FBpp0084711	RPRC012179-PA	SCY1-like protein 2 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN41750_c8_g1_i6	FBpp0311469	RPRC001203-PA	uncharacterized protein LOC106662575 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN41818_c4_g1_i4	FBpp0082932	RPRC006648-PA	chorion peroxidase isoform X2 [Halyomorpha halys]
TRINITY_DN42092_c2_g2_i5	FBpp0074720	RPRC009679-PA	mucolipin-3-like [Halyomorpha halys]
TRINITY_DN42328_c5_g2_i13	FBpp0085074	RPRC000027-PA	secreted Cytochrome-like protein [Pristhesancus plagipennis]

TRINITY_DN424 42_c3_g2_i1	FBpp0310112	RPRC003036 -PA	scavenger receptor class B member 1-like [Halyomorpha halys]
TRINITY_DN426 84_c3_g1_i3	FBpp0309678	RPRC001619 -PA	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase MINDY-3 homolog [Halyomorpha halys]
TRINITY_DN427 43_c6_g1_i12	FBpp0309200	RPRC003224 -PA	nuclear pore complex protein Nup154 isoform X2 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN428 62_c1_g2_i4	FBpp0306194	RPRC006741 -PA	arrestin domain-containing protein 4 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN428 79_c1_g1_i3	FBpp0084248	RPRC000839 -PA	tyrosine kinase receptor Cad96Ca [Cimex lectularius]
TRINITY_DN428 80_c9_g1_i4	FBpp0081930	RPRC015026 -PA	microtubule-associated protein Jupiter isoform X1 [Halyomorpha halys]
TRINITY_DN432 87_c5_g1_i5	FBpp0080114	RPRC009096 -PA	brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 1 isoform X4 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN434 98_c5_g1_i9	FBpp0086741	RPRC009311 -PA	DJ-1 [Triatoma infestans]
TRINITY_DN436 82_c5_g1_i12	FBpp0303309	RPRC009067 -PA	protein couch potato isoform X5 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN437 21_c4_g1_i7	FBpp0079847	RPRC011855 -PA	gastrula zinc finger protein XICGF8.2DB-like isoform X1 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN438 84_c8_g1_i2	FBpp0070489	RPRC003711 -PA	cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase isoform X8 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN439 78_c14_g1_i2	FBpp0070723	RPRC011597 -PA	cyclin-dependent kinase 7 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN440 65_c10_g1_i2	FBpp0309999	RPRC000327 -PA	putative pseudogene chemosensory protein [Triatoma brasiliensis]
TRINITY_DN442 49_c4_g1_i7	FBpp0290106	RPRC014741 -PA	GRB10-interacting GYF protein 2-like isoform X1 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN442 80_c4_g1_i13	FBpp0071418	RPRC010660 -PA	YLP motif-containing protein 1-like isoform X1 [Halyomorpha halys]
TRINITY_DN444 50_c3_g1_i11	FBpp0072100	RPRC013325 -PA	LIM domain-binding protein 2 isoform X3 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN444 86_c6_g2_i14	FBpp0084545	RPRC001137 -PA	uncharacterized protein LOC106689857 [Halyomorpha halys]
TRINITY_DN447 12_c3_g2_i3	FBpp0307412	RPRC009588 -PA	elongation of very long chain fatty acids protein AAEL008004-like [Halyomorpha halys]
TRINITY_DN447 84_c1_g2_i13	FBpp0078370	RPRC009644 -PA	glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase-like isoform X2 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN448 20_c4_g1_i2	FBpp0112945	RPRC008339 -PA	dihydropyrimidinase-like [Cimex lectularius]
TRINITY_DN448 40_c1_g1_i5	FBpp0084080	.	uncharacterized protein LOC106673085 isoform X3 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN449 80_c8_g2_i1	FBpp0290287	RPRC003622 -PA	LOW QUALITY PROTEIN: probable phospholipid-transporting ATPase VD [Halyomorpha halys]
TRINITY_DN451	FBpp0310331	RPRC005641	hydroxymethylglutaryl-CoA lyase, mitochondrial

59_c4_g1_i2		-PA	isoform X2 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN45206_c2_g1_i3	FBpp0078401	RPRC006287-PA	PHD and RING finger domain-containing protein 1 isoform X3 [Halyomorpha halys]
TRINITY_DN45251_c8_g1_i4	FBpp0083688	RPRC009718-PA	uncharacterized protein LOC106661511 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN45288_c7_g1_i1	FBpp0089207	RPRC004932-PA	serpin B8-like [Helicoverpa armigera]
TRINITY_DN45356_c3_g1_i2	FBpp0423061	RPRC011478-PA	fibrinogen C domain-containing protein 1-B-like [Bicyclus anynana]
TRINITY_DN45391_c2_g1_i6	FBpp0073859	RPRC010966-PA	thyroid receptor-interacting protein 11-like isoform X3 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN45402_c5_g1_i6	FBpp0304797	RPRC011763-PA	dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial [Halyomorpha halys]
TRINITY_DN45578_c7_g3_i5	FBpp0308736	.	leucine zipper putative tumor suppressor 2 homolog [Halyomorpha halys]
TRINITY_DN45602_c7_g2_i6	FBpp0309997	RPRC000097-PA	histone acetyltransferase KAT6A isoform X2 [Halyomorpha halys]
TRINITY_DN45620_c1_g2_i10	FBpp0302974	RPRC001923-PA	liprin-alpha-1 isoform X13 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN45638_c2_g1_i3	FBpp0078565	RPRC009657-PA	tRNA (guanine(10)-N2)-methyltransferase homolog isoform X2 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN45782_c0_g1_i15	FBpp0291256	RPRC011047-PA	ATP-dependent chromatin remodeler mi-2 [Euschistus heros]
TRINITY_DN45854_c9_g4_i4	FBpp0291730	RPRC013327-PA	myosin heavy chain, non-muscle isoform X2 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN45854_c9_g4_i5	FBpp0291730	RPRC013327-PA	myosin heavy chain, non-muscle isoform X1 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN46165_c3_g1_i9	FBpp0290848	RPRC003636-PA	RCC1 and BTB domain-containing protein 1 isoform X2 [Ooceraea biro]
TRINITY_DN46170_c4_g1_i14	FBpp0311523	RPRC008334-PA	tyrosine-protein kinase Abl isoform X1 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN46170_c4_g1_i15	FBpp0311523	RPRC008334-PA	tyrosine-protein kinase Abl isoform X1 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN46298_c1_g1_i3	FBpp0303864	RPRC003104-PA	transmembrane protein 94 isoform X3 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN46541_c4_g2_i4	FBpp0305721	RPRC014175-PA	collagen alpha-2(IV) chain-like isoform X1 [Melanaphis sacchari]
TRINITY_DN46747_c0_g1_i11	FBpp0309754	.	kazrin isoform X7 [Cimex lectularius]
TRINITY_DN46792_c1_g1_i6	FBpp0305821	RPRC012943-PA	RNA-binding protein Musashi homolog 2 isoform X6 [Halyomorpha halys]
TRINITY_DN47016_c3_g1_i14	FBpp0311147	RPRC011166-PA	alpha-tocopherol transfer protein-like [Cimex lectularius]
TRINITY_DN47019_c1_g2_i1	FBpp0078898	RPRC015300-PA	UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase [Halyomorpha halys]

TRINITY_DN47124_c1_g1_i10	.	RPRC006507-PA	uncharacterized protein LOC111054365, partial [Nilaparvata lugens]
---------------------------	---	---------------	--

Tabla S3.4. Transcritos subexpresados con anotaciones coincidentes en *blastx* y *blastp* vs. NCBI (nr; insectos), y sus correspondientes coincidencias obtenidas en las búsquedas vs. las proteínas de *D. melanogaster* y *R. prolixus*. El punto representa la ausencia de coincidencia.

Tabla S3.5

Categoría GO	Identificación y término GO	Transcriptos sobreexpresados	Transcriptos subexpresados
Proceso biológico	GO:0009792 - Desarrollo embrionario que termina en nacimiento o eclosión de huevos	TRINITY_DN38955_c7_g1_i2	TRINITY_DN47019_c1_g2_i1
		TRINITY_DN42755_c7_g1_i1	TRINITY_DN39667_c2_g1_i2
		TRINITY_DN44495_c1_g1_i6	TRINITY_DN45854_c9_g4_i4
		TRINITY_DN40178_c0_g1_i17	TRINITY_DN44486_c6_g2_i14
		TRINITY_DN44469_c3_g1_i10	TRINITY_DN46170_c4_g1_i14
	GO:0048598 - Morfogénesis embrionaria	TRINITY_DN38955_c7_g1_i2	TRINITY_DN46541_c4_g2_i4
		TRINITY_DN42755_c7_g1_i1	TRINITY_DN47019_c1_g2_i1
		TRINITY_DN42029_c4_g1_i6	TRINITY_DN45854_c9_g4_i4 e i5
		TRINITY_DN45220_c2_g1_i12	TRINITY_DN46170_c4_g1_i14 e i15
		TRINITY_DN44469_c3_g1_i10	
		TRINITY_DN35940_c10_g1_i1	
	GO:0050890 - Cognición	TRINITY_DN40969_c4_g2_i5	TRINITY_DN43884_c8_g1_i2
		TRINITY_DN39736_c3_g1_i7	TRINITY_DN39667_c2_g1_i2
		TRINITY_DN47087_c7_g2_i3	TRINITY_DN38760_c2_g2_i4
			TRINITY_DN44820_c4_g1_i2
			TRINITY_DN46170_c4_g1_i14 e i15
	GO:0051248 - Regulación negativa de proceso metabólico proteico	TRINITY_DN38955_c7_g1_i2	TRINITY_DN30870_c0_g1_i1
		TRINITY_DN39736_c3_g1_i7	TRINITY_DN36292_c4_g9_i2

		TRINITY_DN45642_c0_g1_i5	TRINITY_DN39667_c2_g1_i2
		TRINITY_DN40178_c0_g1_i17	TRINITY_DN46792_c1_g1_i6
		TRINITY_DN35940_c10_g1_i1	TRINITY_DN41306_c3_g1_i14
			TRINITY_DN45288_c7_g1_i1
	GO:0035272 - Desarrollo del sistema exocrino	TRINITY_DN38955_c7_g1_i2	TRINITY_DN42442_c3_g2_i1
		TRINITY_DN42755_c7_g1_i1	TRINITY_DN45854_c9_g4_i4 e i5
		TRINITY_DN44469_c3_g1_i10	TRINITY_DN39600_c10_g1_i1
			TRINITY_DN40486_c1_g1_i2
			TRINITY_DN38082_c13_g1_i4
	GO:0044087 - Regulación de la biogénesis de los componentes celulares	TRINITY_DN45444_c1_g1_i3	TRINITY_DN46747_c0_g1_i11
		TRINITY_DN44469_c3_g1_i10	TRINITY_DN38760_c2_g2_i4
		TRINITY_DN42104_c2_g2_i4	TRINITY_DN40486_c1_g1_i2
		TRINITY_DN42671_c4_g1_i4	TRINITY_DN42092_c2_g2_i5
			TRINITY_DN42880_c9_g1_i4
			TRINITY_DN46170_c4_g1_i14 e i15
	GO:0030029 - Proceso basado en filamentos de actina	TRINITY_DN38955_c7_g1_i2	TRINITY_DN39667_c2_g1_i2
		TRINITY_DN40371_c4_g1_i11	TRINITY_DN45854_c9_g4_i4 e i5
		TRINITY_DN45673_c9_g1_i6	TRINITY_DN40486_c1_g1_i2
		TRINITY_DN43406_c3_g5_i2	TRINITY_DN36496_c0_g2_i1
		TRINITY_DN44469_c3_g1_i10	TRINITY_DN46170_c4_g1_i14
	GO:0061564 - Desarrollo de axones	TRINITY_DN44469_c3_g1_i10	TRINITY_DN45620_c1_g2_i10
		TRINITY_DN42104_c2_g2_i4	TRINITY_DN43884_c8_g1_i2
			TRINITY_DN47019_c1_g2_i1
			TRINITY_DN46747_c0_g1_i11
			TRINITY_DN44450_c3_g1_i11
			TRINITY_DN45602_c7_g2_i6
			TRINITY_DN46170_c4_g1_i14

			TRINITY_DN39600_c10_g1_i1
			TRINITY_DN38760_c2_g2_i4
	GO:0048732 - Desarrollo de las glándulas	TRINITY_DN46298_c1_g1_i12	TRINITY_DN42442_c3_g2_i1
		TRINITY_DN42755_c7_g1_i1	TRINITY_DN45854_c9_g4_i4
		TRINITY_DN44469_c3_g1_i10	TRINITY_DN39600_c10_g1_i1
		TRINITY_DN35940_c10_g1_i1	TRINITY_DN40486_c1_g1_i2
			TRINITY_DN38082_c13_g1_i4
	GO:0031647 - Regulación de la estabilidad de proteínas	TRINITY_DN39736_c3_g1_i7	TRINITY_DN46165_c3_g1_i9
		TRINITY_DN35940_c10_g1_i1	TRINITY_DN46170_c4_g1_i14 e i15
Función molecular	GO:0008092 - Unión a proteínas del citoesqueleto	TRINITY_DN45392_c1_g1_i5	TRINITY_DN45854_c9_g4_i4
		TRINITY_DN38955_c7_g1_i2	TRINITY_DN39600_c10_g1_i1
		TRINITY_DN42356_c1_g1_i17	TRINITY_DN38760_c2_g2_i4
		TRINITY_DN40387_c3_g1_i3	TRINITY_DN40486_c1_g1_i2
		TRINITY_DN40371_c4_g1_i11	TRINITY_DN42880_c9_g1_i4
		TRINITY_DN45673_c9_g1_i6	
		TRINITY_DN42671_c4_g1_i4	
Componente celular	GO:0099568 - Región citoplasmática	TRINITY_DN38955_c7_g1_i2	TRINITY_DN45620_c1_g2_i10
		TRINITY_DN40387_c3_g1_i3	TRINITY_DN45854_c9_g4_i4
		TRINITY_DN45673_c9_g1_i6	TRINITY_DN36496_c0_g2_i1
		TRINITY_DN45220_c2_g1_i12	TRINITY_DN46170_c4_g1_i14
	GO:0030054 - Unión celular	TRINITY_DN38955_c7_g1_i2	TRINITY_DN45620_c1_g2_i10
		TRINITY_DN45220_c2_g1_i12	TRINITY_DN40181_c4_g1_i2
		TRINITY_DN44469_c3_g1_i10	TRINITY_DN45854_c9_g4_i4
			TRINITY_DN36292_c4_g4_i4
			TRINITY_DN40476_c6_g1_i1

			TRINITY_DN46170_c4_g1_i14
	GO:0045177 - Zona apical de la célula	TRINITY_DN45673_c9_g1_i6	TRINITY_DN45854_c9_g4_i4
		TRINITY_DN45220_c2_g1_i12	TRINITY_DN44840_c1_g1_i5
		TRINITY_DN44469_c3_g1_i10	TRINITY_DN42879_c1_g1_i3
			TRINITY_DN46170_c4_g1_i14
Tabla S3.5. Transcritos sobre- y sub-expresados en cada categoría enriquecida dentro de cada base de datos de GO (analizado en la Tabla 3.3).			

Figura S3.2

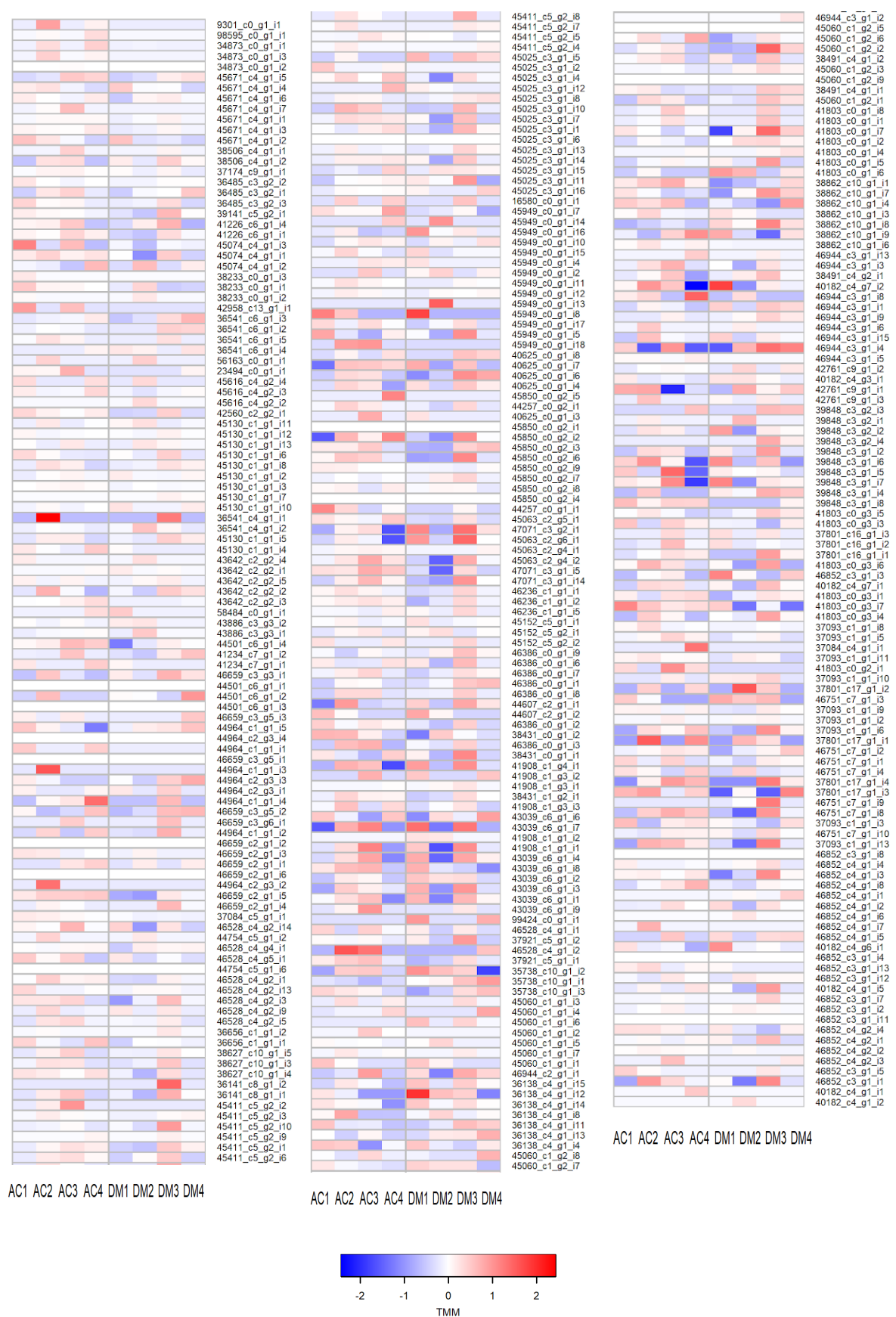


Figura S3.2. Mapas de calor del clado CYP3. Las filas representan cada uno de los transcritos graficados según los valores de TMM transformados mediante \log_2 y centrados según su media. A la derecha se detalla el número de identificación del transcritos en el transcriptoma. Las columnas representan cada una de las ocho réplicas biológicas utilizadas. AC: muestras tratadas con acetona. DM: muestras tratadas con deltametrina. Los valores se representan según una escala de color que va de azul (menos expresado) a rojo (más expresado).

Figura S3.3



Figura S3.3. Mapas de calor del clado CYP4. Las filas representan cada uno de los transcritos graficados según los valores de TMM transformados mediante \log_2 y centrados según su media. A

la derecha se detalla el número de identificación del transcrito en el transcriptoma. Las columnas representan cada una de las ocho réplicas biológicas utilizadas. AC: muestras tratadas con acetona. DM: muestras tratadas con deltametrina. Los valores se representan según una escala de color que va de azul (menos expresado) a rojo (más expresado).

Figura S3.4

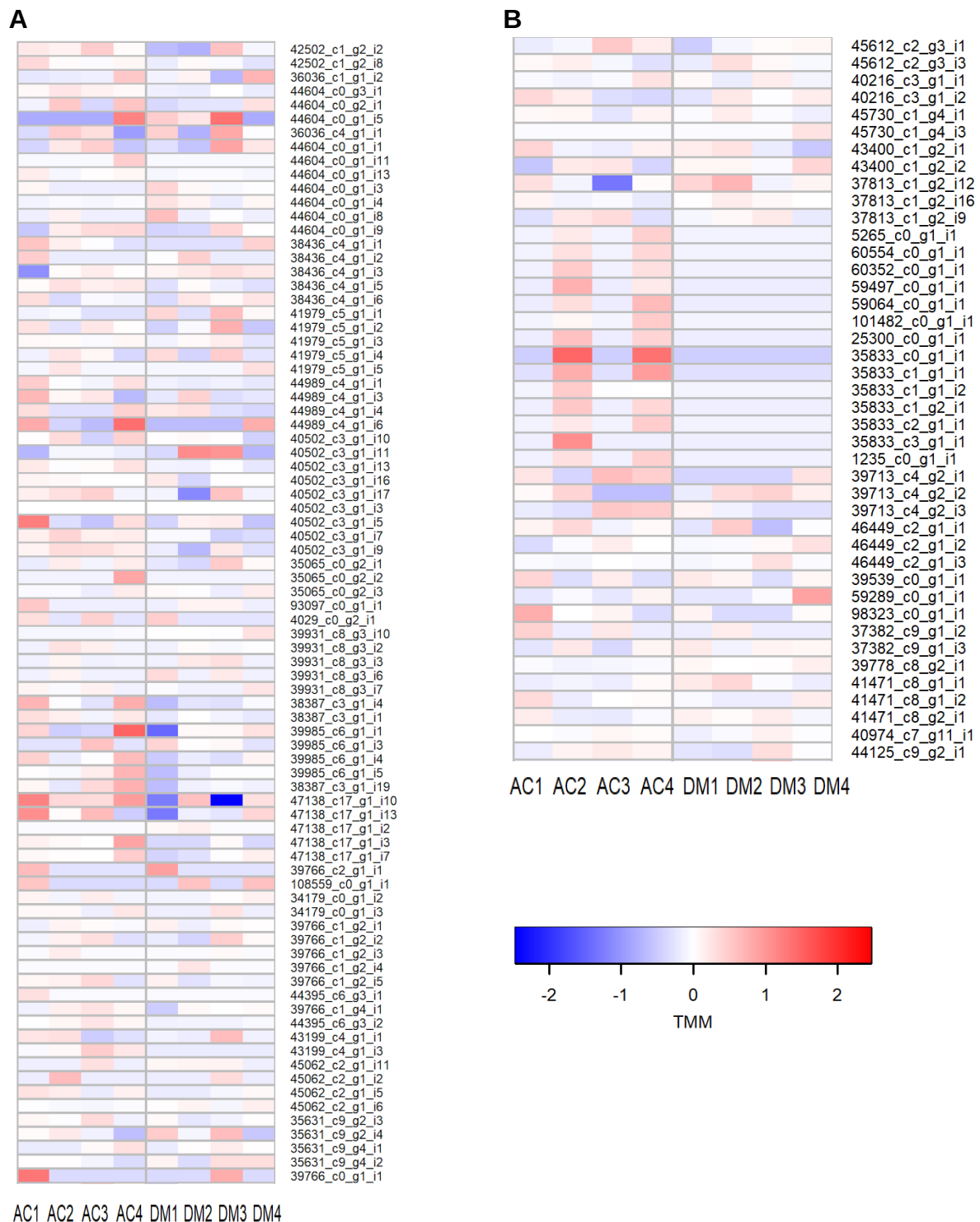


Figura S3.4. Mapas de calor de la superfamilia CCE. A) Clase de procesamiento de

hormonas y feromonas. B) Clase de neuro/desarrollo. Las filas representan cada uno de los transcritos graficados según los valores de TMM transformados mediante \log_2 y centrados según su media. A la derecha se detalla el número de identificación del transcrito en el transcriptoma. Las columnas representan cada una de las ocho réplicas biológicas utilizadas. AC: muestras tratadas con acetona. DM: muestras tratadas con deltametrina. Los valores se representan según una escala de color que va de azul (menos expresado) a rojo (más expresado).

Figura S3.5

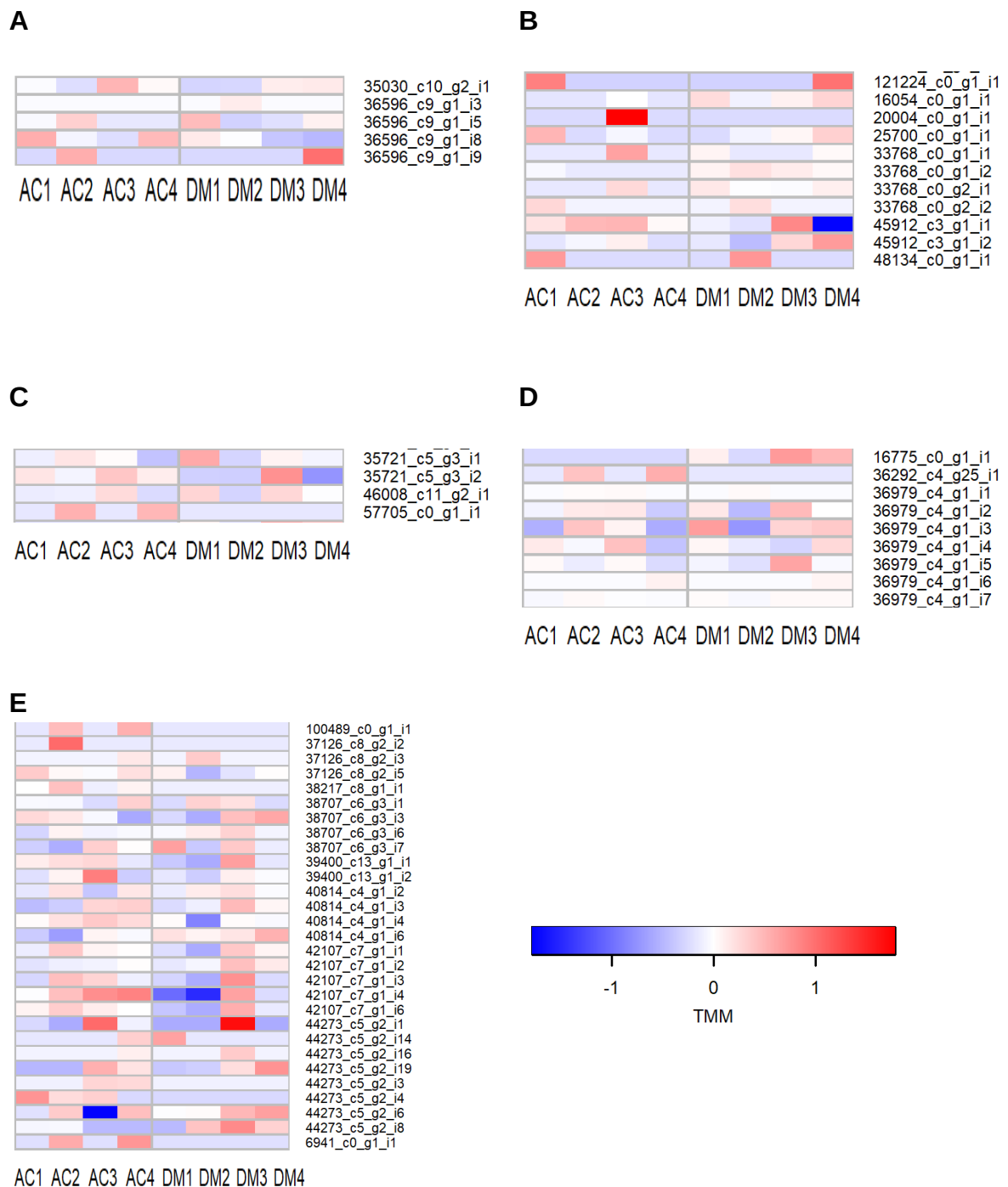


Figura S3.5. Mapas de calor de la superfamilia GST. A) Clase Delta. B) Clase Omega. C) Clase Theta. D) Clase Zeta. E) Clase Sigma. Las filas representan cada uno de los transcritos graficados según los valores de TMM transformados mediante \log_2 y centrados según su media. A la derecha se detalla el número de identificación del transcripto en el transcriptoma. Las columnas representan cada una de las ocho réplicas biológicas utilizadas. AC: muestras tratadas con acetona. DM: muestras tratadas con deltametrina. Los valores se representan según una escala de color que va de azul (menos expresado) a rojo (más expresado).

Figura S3.6

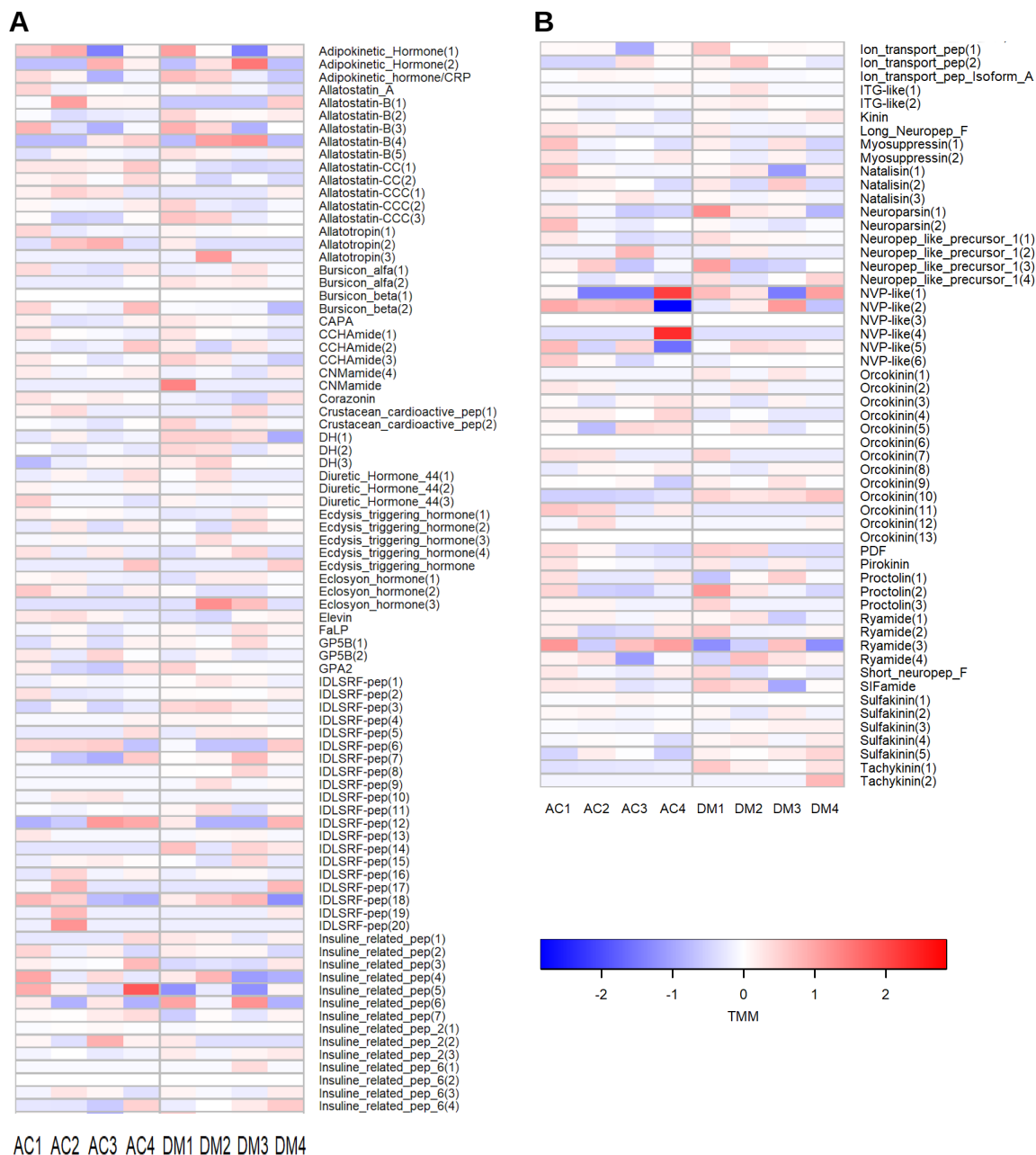


Figura S3.6 Mapas de calor de transcritos codificantes para neuropéptidos. Las filas representan cada uno de los transcritos graficados según los valores de TMM transformados mediante \log_2 y centrados según su media. A la derecha se detalla el nombre del neuropéptido

según coincidencia de búsquedas de BLAST, utilizando como base de datos de referencia los neuropéptidos conocidos en *R. prolixus* (Ons *et al.* 2016). Las columnas representan cada una de las ocho réplicas biológicas utilizadas. AC: muestras tratadas con acetona. DM: muestras tratadas con deltametrina. Los valores se representan según una escala de color que va de azul (menos expresado) a rojo (más expresado).

Material suplementario electrónico

Debido a su extensión, los siguientes archivos están disponibles en formato digital:

Archivo suplementario SE1: Tabla de anotación del transcriptoma de *T. infestans*.

Archivo suplementario SE2: Secuencias nucleotídicas de transcritos diferencialmente expresados.

Anexo II:

Detalle de protocolos utilizados

Protocolo de extracción de ARN

-La muestra conservada en TRIzol se homogeniza con un pistilo plástico dentro del tubo tipo eppendorf, manteniendo la muestra en hielo durante todo el proceso.

-Se adicionan 0,2 ml de cloroformo por cada ml de TRIzol utilizado. Se incuba 2-3 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga a 12000 x g durante 15 minutos.

-La fase acuosa recuperada se coloca en un nuevo tubo y se le adicionan 0,5 ml de alcohol isopropílico por cada ml de TRIzol utilizado. Se incuba a temperatura ambiente por 10 minutos y se coloca 1 hora a -20°C para luego realizar una centrifugación a 12000 x g durante 10 minutos.

-Se elimina el sobrenadante y el *pellet* obtenido se lava con 1 ml de alcohol etílico por cada ml de TRIzol utilizado. La muestra se vortexea brevemente y se centrifuga a 7500 x g durante 5 minutos.

-Se elimina el sobrenadante y el pellet de ARN obtenido se deja secar para luego ser resuspendido en agua estéril ultrapura tratada con DEPC.

-Para evaluar la integridad y concentración del ARN extraído se realiza una electroforesis en gel de agarosa 1%. La cuantificación de la muestra se realiza con el programa ImageJ.

-El ARN resuspendido se conserva a -80°C hasta su utilización.

Protocolo de síntesis de ADNc

-Para eliminar restos de ADN genómico, el ARN molde es tratado con la enzima DNAsa I (Thermo Fisher Scientific) durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, la DNAsa I se inactiva con EDTA durante 10 minutos a 65°C. Los volúmenes de reacción se muestran en la siguiente tabla.

Reactivo	Cantidad/Concentración final
Enzima DNAsa I (Thermo Fisher Scientific)	0,5 unidades
Buffer 10X	1X
ARN total	1µg
H2O ultrapura estéril	Hasta 10µl

-Para la síntesis de ADNc, se adiciona primer poli-T y se incuba durante 5 minutos a 70°C. Inmediatamente después el tubo se coloca en hielo por 5 minutos, y se adiciona la mezcla de reacción para síntesis de ADNc, con excepción de la enzima. La mezcla se incuba por 2 minutos a 37°C. Posteriormente se le adiciona la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Promega) y se incuba por 2 horas a 42°C. Finalmente, la reacción se inactiva durante 5 minutos a 85°C. Los volúmenes de reacción se muestran en la siguiente tabla.

Reactivo	Cantidad/Concentración final
Primer poli-T	4 µM
Buffer Enzima MMLV-RT 5X (Promega)	1X
dATP 10 mM (Inbio Highway)	1 mM
dCTP 10 mM (Inbio Highway)	1 mM
dTTP 10 mM (Inbio Highway)	1 mM
dGTP 10 mM (Inbio Highway)	1 mM
Inhibidor de RNAsas (Ribolock, Thermo Fisher Scientific)	20 unidades
Enzima MMLV-RT (Promega)	200 unidades
H2O ultrapura estéril	Hasta 25µl

-Para comprobar la eficiencia de la síntesis de ADNc, éste se utiliza como molde para una reacción de PCR.

Protocolo de PCR convencional

Las reacciones de PCR convencional se llevaron a cabo con los reactivos y concentraciones que se muestran en la siguiente tabla:

Reactivo	Cantidad/Concentración final
Buffer 10X	1X
MgCl ₂ 50 mM	1,5 mM
dNTPs 10 mM	0,25 mM
Primer <i>forward</i> 10 μ M	0,25 μ M
Primer <i>reverse</i> 10 μ M	0,25 μ M
Molde	1 μ l/20 μ l finales
Enzima Taq Pegasus (PB-L)	1 unidad/20 μ l finales
H ₂ O ultrapura estéril	Hasta completar volumen

Las reacciones se realizaron en el termociclador Hybaid MBS 0.2S según el siguiente programa: 1 x 10' - 95°C, 30/40 x (30' - 95°C, 30' - T° a, 30' - 72°C), con un ciclo de amplificación final de 10' a 72°C.

Protocolo de PCR en tiempo real

Las reacciones de PCR en tiempo real se llevaron a cabo con los reactivos y concentraciones que se muestran en la siguiente tabla:

Reactivo	Cantidad/Concentración final
FastStart SYBR Green Master (Roche)	1X
Primer <i>Forward</i>	0,2 μ M
Primer <i>Reverse</i>	0,2 μ M
Molde de ADNc	1,5 μ l

H2O ultrapura estéril	hasta completar volumen
-----------------------	-------------------------

El ciclado utilizado consta de un ciclo de 10' a 95°C y 40 ciclos de (15' - 95°C; 30' - 58°C; 30' - 72°C).

Protocolo de electroforesis en gel de agarosa

-Se disuelve 1 gr. de agarosa en un matraz erlenmeyer con 100 ml de *buffer* TBE (ver Soluciones utilizadas) y se calienta en microondas hasta alcanzar hervor. Se colocan 2 μ l de bromuro de etidio para teñir y se vuelca en una cama acrílica con un peine que permite la formación de pocillos de siembra.

-El gel se coloca en una cuba de electroforesis con *buffer* TBE y las muestras se cargan en los pocillos con 3 μ l de formamida cada 10 μ l. Se utiliza un marcador de peso molecular de 100 pb (PB-L). Posteriormente se conecta a 100 V y amperaje constante hasta alcanzar la separación de bandas deseada.

-El gel se visualiza en un transiluminador de luz ultravioleta. Las fotos se toman con una cámara *CANON Eos Rebel*.

Protocolo de purificación de muestra a partir de gel de agarosa

Para recuperar el ADN contenido en el gel de agarosa luego de la electroforesis se utilizó el *kit* de extracción de *PB-L*, según se indica a continuación:

-El trozo de agarosa que posee el ADN a purificar es cortado, pesado y derretido con 300 μ l de *Buffer A* por cada 100mg de gel. La mezcla se agita a 55°C hasta lograr la disolución total de la agarosa.

-La solución obtenida se carga en una columna y se centrifuga 1 minuto a 1100 x g. El filtrado se desecha y se colocan 750 μ l de *buffer B* en la columna. Se centrifuga 1 minuto a 1100 x g, se descarta el filtrado y se centrifuga nuevamente para eliminar restos de *buffer*.

-La columna se coloca en un tubo de 1,5 μ l estéril, y se agregan 50 μ l de agua ultrapura estéril. Luego de 1 minuto, se centrifuga 1 minuto a 1100 x g para obtener la solución de ADN.

Protocolo de síntesis de ARNdc

El producto de PCR generado con *primers* específicos sumados a un fragmento de la secuencia promotora de T7 (ver Materiales y métodos, Tabla 2) fue purificado a partir de un gel de agarosa y utilizado como molde para una segunda reacción de PCR utilizando como único *primer* el que posee la secuencia promotora de la enzima T7 completa (denominado T7 full, ver Materiales y métodos, Tabla 2). La amplificación obtenida se utiliza como molde para la reacción de síntesis de ARNdc, con los reactivos y concentraciones que se indican en la siguiente tabla:

Reactivo	Cantidad/Concentración final
ATP 75mM	2 μ l/7,5 mM
CTP 75mM	2 μ l/7,5 mM
GTP 75mM	2 μ l/7,5 mM
UTP 75mM	2 μ l/7,5 mM
10X reaction buffer	2 μ l/1X
Enzima ARN Pol T7	1 μ l
Producto de PCR	9 μ l
Volumen final	20 μ l

La mezcla de reacción es colocada a 37°C *overnight*. El ARNdc obtenido es precipitado llevando el volumen de la reacción a 200 μ l con agua ultrapura estéril, y adicionando 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3M y 1,2 volúmenes de alcohol isopropílico. La mezcla se refrigera a -20°C *overnight*. Posteriormente, se centrifuga la muestra a máxima velocidad por 20 minutos. Se quita el sobrenadante y se lava con 500 μ l de etanol absoluto. Se vortexea y centrifuga nuevamente a 7500 xg durante 5 minutos. El sobrenadante se elimina, el *pellet* se deja secar y se resuspende con 25 μ l de solución salina (ver Soluciones

utilizadas). La cuantificación se realiza en un gel de agarosa 1%, con una diluciones seriadas de la muestra.

Soluciones utilizadas

-Solución salina para *R. prolixus* (Te Brugge *et al.* 2011):

La solución salina es preparada con NaCl (129 mM); KCl (8,6 mM); CaCl₂ (2,0 mM); MgCl₂ (8,5 mM); NaH₂CO₃ (10,2 mM); NaH₂PO₄ (4,3 mM); Hepes (8,6 mM), PH=7. Posteriormente, es filtrada con filtro de jeringa de 0,2 μ m.

-TBE *Buffer* 3X:

Se colocan 32,4 gr de Tris *buffer* y 16,5 gr de ácido bórico en 800 ml de agua bi-destilada en un matraz erlenmeyer con agitación magnética. Se adicionan 12 ml de 0,5M EDTA-Na PH=8, y el volumen se ajusta a 1 L con agua bi-destilada.

Anexo III:

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

AKH: hormona adipokinética

AMCHA: Iniciativa de los Países Amazónicos para la Vigilancia y el Control de la Enfermedad de Chagas.

ARN: ácido ribonucleico

ARNdc: ácido ribonucleico de doble cadena

ARNi: ácido ribonucleico de interferencia

AST: alostatina

AT: alatotropina

ATP: adenosina trifosfato

CAPA: *Capability*

CCAP: péptido cardio-acelerador de crustáceos

CCEs: Carboxil/colinesterasas.

CCHa: CCH-amida

CT-DH: Calcitonina

CRF-DH: hormona diurética CRF

CTP: citidina trifosfato

CYPs: Citocromos P450.

CZ: corazonina

DDT: dicloro difenil tricloroetano

DL: dosis letal

dNTPs: desoxirribonucleósidos trifosfato

EH: hormona de la eclosión

ETH: Hormona disparadora de la ecdisis

FLPs: péptidos tipo FMRFa

GABA: ácido γ -aminobutírico

GO: Gene Ontology

GSTs: Glutación Tranferasas

GTP: guanosina trifosfato

HCH: hexaclorociclohexano

INCOSUR: Iniciativa del Cono Sur para controlar e eliminar la enfermedad de Chagas

IPA: Iniciativa de los Países Andinos de Control de la Transmisión Vectorial y Transfusional de la Enfermedad de Chagas

IPCA: Iniciativa de los Países de América Central para el Control de la Transmisión Vectorial, Transfusional y la Atención Médica de la Enfermedad de Chagas

ITP: péptido transportador de iones

kdr: knockdown resistance

Km: kilómetros

mg: miligramos

ml: mililitros

NCBI: *National Center for Biotechnological Information*

NPAA: neuroparsina A

NPF: neuropéptido largo F

NPLP: *neuropeptide like precursor*

MIP: péptido mioinhibitorio

MS: miosupresina

OK: orcokinina

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

PK: pirokinina

PRL: proctolinas

PTTH: hormona protoracicotrópica

ROS: especies reactivas del oxígeno

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

RYa: RYamida

rNTPs: ribonucleótidos trifosfato

SK: sulfakininas

SLC: *solute carriers*

SNC: sistema nervioso central

sNPF: neuropéptido corto F

spp.: especies

UTP: uridina trifosfato

µg: microgramos

µl: microlitros

Anexo IV:

Glosario

- **BLAST**: programa diseñado para encontrar regiones de similitud local entre secuencias. Compara las secuencias de nucleótidos o proteínas con bases de datos de secuencias y calcula su significancia estadística (Altschul *et al.* 1990). Este programa posee diferentes modalidades, entre las que se encuentran:
 - *blastp*: busca en una base de datos de proteínas usando una secuencia proteica como *query*.
 - *blastx*: busca en una base de datos nucleotídica traducida a aminoácidos, usando una secuencia nucleotídica traducida a aminoácidos como *query*.
 - *tblastn*: busca en una base de datos nucleotídica traducida a aminoácidos, usando una secuencia proteica como *query*.
- **cluster**: grupo de dos o más genes, a menudo ubicados en la misma región del genoma, que codifican para proteínas que comparten funciones similares.
- **contig**: conjunto de segmentos de ADN que se superponen formando una secuencia consenso.
- **FPKM**: unidad de medida de expresión de genes, calculada según la cantidad de fragmentos por kilobase del transcripto al que mapean, por millón de lecturas mapeadas.
- **Pfam**: colección de familias de proteínas, cada una representada por alineamientos múltiples de secuencias y su representación probabilística, denominada *hidden Markov models* (HMM) (Finn 2016).
- **supercontig**: porción de secuencia de un genoma compuesta por *contigs* y espacios sin información de secuencia, que se representan con *N*.
- **TMM** (del inglés *trimmed mean of M values*) método de normalización utilizado para estimar los niveles relativos de ARN en un experimento de *RNA-seq*. Estima factores de escala entre las muestras para ser aplicados a los métodos estadísticos de análisis de expresión diferencial (Robinson 2010).
- **TPM** (del inglés *transcripts per million*): medida de abundancia de transcriptos en las que los valores de mapeo están normalizados respecto de la longitud de cada transcripto, el número de lecturas que mapean a cada uno, y el número total de lecturas mapeadas a todos los transcriptos de la muestra. Se aplica un factor de escala de manera que los valores de TPM sumen un millón en cada muestra (Wagner 2012).

- **query**: secuencia que se desea comparar con las secuencias de la base de datos de interés mediante el programa BLAST.

Bibliografia

Abad-Franch, F., Aguilar V, H., Paucar C, A., Lorosa, E., & Noireau, F. (2002). Observations on the Domestic Ecology of *Rhodnius ecuadoriensis* (Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **97**(2), 199-202.

Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., & Rezaie, A. (2004). Pesticides and oxidative stress: a review. *Med Sci Monit*, **10**(6), A141-147.

Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., ... Craig Venter, J. (2000). The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, **287**(5461), 2185-95.

Adelman, Z. N., Kilcullen, K. A., Koganemaru, R., Anderson, M. A. E., Anderson, T. D., & Miller, D. M. (2011). Deep sequencing of pyrethroid-resistant bed bugs reveals multiple mechanisms of resistance within a single population. *PLoS ONE*, **6**(10), e26228.

Aguilar, H. M., Abad-Franch, F., Dias, J. C. P., Junqueira, A. C. V., & Coura, J. R. (2007). Chagas disease in the Amazon Region. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **102**(suppl 1), 47-56.

Ahmed, S., Wilkins, R. M., & Mantle, D. (1998). Comparison of proteolytic enzyme activities in adults of insecticide resistant and susceptible strains of the housefly *M. domestica* L. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **28**, 629-639.

Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Davis, R. E., ... Staudt, L. M. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, **403**, 503.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, **215**(3), 403-410.

Altstein, M., & Nässel, D. R. (2010). Neuropeptide Signaling in Insects. En A. G. Geary, Timothy G. Maule, ed., *Neuropeptide Systems as Targets for parasite and Pest Control* , New York, pp. 155-165.

Alves-Bezerra, M., De Paula, I. F., Medina, J. M., ... Gondim, K. C. (2016). Adipokinetic hormone receptor gene identification and its role in triacylglycerol metabolism in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **69**, 51-60.

Alves, S. N., Serrão, J. E., & Melo, A. L. (2010). Alterations in the fat body and midgut of *Culex quinquefasciatus* larvae following exposure to different insecticides. *Micron*, **41**(6), 592-597.

Alzogaray, R. A., & Zerba, E. N. (2016). *Rhodnius prolixus* intoxicated. *Journal of Insect Physiology*, **97**, 93-113.

Amichot, M., Brun, A., Cuany, A., ... Bergé, J. (1998). Induction of cytochrome P450 activities in *Drosophila melanogaster* strains susceptible or resistant to insecticides. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* , **121**(1-3), 311-319.

Anamika, K., Verma, S., Jere, A., & Desai, A. (2016). Transcriptomic Profiling Using Next Generation Sequencing - Advances, Advantages, and Challenges. En J. K. Kulski, ed., *Next Generation Sequencing Advances, Applications and Challenges* , AvE4EvA MuViMix Records, pp. 112-151.

Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Recuperado a partir de <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>

Anjum, S. G., Xu, W., Nikkholgh, N., ... Veraksa, A. (2013). Regulation of Toll Signaling and Inflammation by β -Arrestin and the SUMO Protease Ulp1. *Genetics*, **195**(4), 1307.

Araújo, R. A., Guedes, R. N. C., Oliveira, M. G. A., & Ferreira, G. H. (2008). Enhanced activity of carbohydrate- and lipid-metabolizing enzymes in insecticide-resistant populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Bulletin of Entomological Research*, **98**(4), 417-424.

Araujo, R. N., Campos, I. T. N., Tanaka, A. S., ... Pereira, M. H. (2007). Brasiliensin: A novel intestinal thrombin inhibitor from *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) with an important role in blood intake. *International Journal for Parasitology*, **37**(12), 1351-1358.

Araujo, R. N., Santos, A., Pinto, F. S., Gontijo, N. F., Lehane, M. J., & Pereira, M. H. (2006). RNA Interference of the Salivary Gland Nitrophorin 2 in the Triatomine Bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA Ingestion or Injection. *Insect biochemistry and molecular biology*, **36**(9), 683-693.

Araujo, R. N., Soares, A. C., Paim, R. M. M., ... Pereira, M. H. (2009). The role of salivary nitrophorins in the ingestion of blood by the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Reduviidae: Triatominae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **39**(2), 83-89.

Araújo, S. J., Aslam, H., Tear, G., & Casanova, J. (2005). mummy/cystic encodes an enzyme required for chitin and glycan synthesis, involved in trachea, embryonic cuticle and CNS development—Analysis of its role in *Drosophila* tracheal morphogenesis. *Developmental Biology*, **288**(1), 179-193.

Aravindan, V., Muthukumaravel, S., & Gunasekaran, K. (2014). Interaction affinity of delta and epsilon class glutathione-s-transferases (GSTs) to bind with DDT for detoxification and conferring resistance in *Anopheles gambiae*, a malaria vector. *Journal of Vector Borne Diseases*, **51**(1), 8-15.

Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., ... Sherlock, G. (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics*, **25**, 25.

Ashhurst, D. E. (1982). The Structure and Development of Insect Connective Tissues. En R. C. King & H. Akai, eds., *Insect Ultrastructure: Volume 1*, Boston, MA: Springer US, pp. 313-350.

Ashton-Beaucage, D., Udell, C. M., Gendron, P., ... Therrien, M. (2014). A functional screen reveals an extensive layer of transcriptional and splicing control underlying RAS/MAPK signaling in *Drosophila*. *PLoS biology*, **12**(3), e1001809-e1001809.

Assumpção, T. C. F., Eaton, D. P., Pham, V. M., ... Ribeiro, J. M. C. (2012). An Insight into the Sialotranscriptome of *Triatoma matogrossensis*, a Kissing Bug Associated with Fogo Selvagem in South America. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **86**(6), 1005-1014.

Audsley, N., & Down, R. E. (2015). G protein coupled receptors as targets for next generation pesticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **67**, 27-37.

Audsley, N., McIntosh, C., & Phillips, J. E. (1992). Isolation of a neuropeptide from locust corpus cardiacum which influences ileal transport. *The Journal of Experimental Biology*, **173**(1), 261.

Aufauvre, J., Misme-Aucouturier, B., Viguès, B., Texier, C., Delbac, F., & Blot, N. (2014). Transcriptome analyses of the honeybee response to *Nosema ceranae* and insecticides. *PLoS ONE*, **9**(3), e91686.

- Aufderheide, A. C., Salo, W., Madden, M., ... Allison, M. (2004). A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **101**(7), 2034.
- Bachowski, S., Xu, Y., Stevenson, D. E., Walborg, E. F., & Klaunig, J. E. (1998). Role of Oxidative Stress in the Selective Toxicity of Dieldrin in the Mouse Liver. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **150**(2), 301-309.
- Bacigalupo, A., Segura, J. A., García, A., Hidalgo, J., Galuppo, S., & Cattán, P. E. (2006). First finding of Chagas disease vectors associated with wild bushes in the Metropolitan Region of Chile. *Revista medica de Chile*, **134**(10), 1230-1236.
- Bai, X., Mamidala, P., Rajarapu, S. P., Jones, S. C., & Mittapalli, O. (2011). Transcriptomics of the bed bug (*Cimex lectularius*). *PLoS ONE*, **6**(1), e16336.
- Barberà, M., & Martínez-Torres, D. (2017). Identification of the prothoracicotropic hormone (Ptth) coding gene and localization of its site of expression in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Insect Molecular Biology*, **26**(5), 654-664.
- Bargues, M. D., Klisiowicz, D. R., Panzera, F., ... Mas-Coma, S. (2006). Origin and phylogeography of the Chagas disease main vector *Triatoma infestans* based on nuclear rDNA sequences and genome size. *Infection, Genetics and Evolution*, **6**(1), 46-62.
- Bass, C., Denholm, I., Williamson, M. S., & Nauen, R. (2015). The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **121**, 78-87.
- Baum, J. A., Bogaert, T., Clinton, W., ... Roberts, J. (2007). Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology*, **25**, 1322-1326.
- Bellés, X. (2010). Beyond *Drosophila*: RNAi In Vivo and Functional Genomics in Insects. *Annual Review of Entomology*, **55**, 111-128.
- Bendena, W. G. (2010). Neuropeptide Physiology in Insects. En T. G. Geary & A. G. Maule, eds., *Neuropeptide Systems as Targets for parasite and Pest Control*, New York: Springer Science+Business Media, LLC dual imprint, pp. 166-191.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G., & Brunak, S. (2004). Improved Prediction of Signal Peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology*, **340**(4), 783-795.
- Berenbaum, M. R. (2002). Postgenomic Chemical Ecology: from genetic code to ecological interactions. *Journal of Chemical Ecology*, **28**(5).
- Bernstein, E., Kim, S. Y., Carmell, M. A., ... Hannon, G. J. (2003). Dicer is essential for mouse development. *Nature Genetics*, **35**, 215.
- Bezerra do Nascimento, A. R., Fresia, P., Cônsoli, F. L., & Omoto, C. (2015). Comparative transcriptome analysis of lufenuron-resistant and susceptible strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *BMC Genomics*, **16**(985). doi:10.1186/s12864-015-2183-z
- Bhatt, G., da Silva, R., & Orchard, I. (2014). The molecular characterization of the kinin transcript and the physiological effects of kinins in the blood-gorging insect, *Rhodnius prolixus*. *Peptides*, **53**, 148-158.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, **5**, 9-19.

- Blariza, M. J., Grosso, C. G., & García, B. A. (2017). Silencing of Two Vitellogenin Genes Inhibits Oviposition in the Chagas Disease Vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **97**(2), 477-480.
- Board, P. G., Baker, R. T., Chelvanayagam, G., & Jermini, L. S. (1997). Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. *Biochem. J.*, **328**, 929-935.
- Board, P. G., Coggan, M., Chelvanayagam, G., ... Pandit, J. (2000). Identification, Characterization, and Crystal Structure of the Omega Class Glutathione Transferases. *Journal of Biological Chemistry*, **275**(32), 24798-24806.
- Bogwitz, M. R., Chung, H., Magoc, L., ... Daborn, P. J. (2005). Cyp12a4 confers lufenuron resistance in a natural population of *Drosophila melanogaster*. *PNAS September*, **6**, 12807-12812.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, **30**(15), 2114–2120.
- Bonizzoni, M., Afrane, Y., Dunn, W. A., ... Yan, G. (2012). Comparative transcriptome analyses of deltamethrin-resistant and -susceptible *Anopheles gambiae* mosquitoes from Kenya by RNA-Seq. *PLoS one*, **7**(9), e44607.
- Bonizzoni, M., Ochomo, E., Dunn, W. A., ... Yan, G. (2015). RNA-seq analyses of changes in the *Anopheles gambiae* transcriptome associated with resistance to pyrethroids in Kenya: Identification of candidate-resistance genes and candidate-resistance SNPs. *Parasites and Vectors*, **8**, 474.
- Bou Aoun, R., Hetru, C., Troxler, L., Doucet, D., Ferrandon, D., & Matt, N. (2010). Analysis of thioester-containing proteins during the innate immune response of *Drosophila melanogaster*. *Journal of innate immunity*, **3**(1), 52-64.
- Boucias, D. G., Stokes, C., Storey, G., & Pendland, J. . (1996). The effects of imidacloprid on the termite *Reticulitermes flavipes* and its interaction with the mycopathogen *Beauveria bassiana*. *Pflan. Nachr. Bayer*, **49**, 103-144.
- Brener, Z. (1971). Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.*, **13**(3), 171-178.
- Bucher, E. H., & Huszar, P. C. (1999). Sustainable management of the Gran Chaco of South America: Ecological promise and economic constraints. *Journal of Environmental Management*, **57**(2), 99-108.
- Buckingham, S. D., Ihara, M., Sattelle, D. B., & Matsuda, K. (2017). Mechanisms of Action, Resistance and Toxicity of Insecticides Targeting GABA Receptors. *Current Medicinal Chemistry*, **24**(27), 2935-2945.
- Burkart, C., Qiu, F., Brendel, S., ... Bullard, B. (2007). Modular Proteins from the *Drosophila* salimus (sls) Gene and their Expression in Muscles with Different Extensibility. *Journal of Molecular Biology*, **367**(4), 953-969.
- Busvine, J. R. (1951). Mechanism of Resistance to Insecticide in Houseflies. *Nature*, **168**, 193.
- Cabello, G., Galaz, S., Botella, L., ... Juarranz, A. (2003). The pesticide malathion induces alterations in actin cytoskeleton and in cell adhesion of cultured breast carcinoma cells. *International Journal of Oncology*, **23**(3), 697-704.
- Caers, J., Boonen, K., Van Den Abbeele, J., Van Rompay, L., Schoofs, L., & Van Hiel, M. B. (2015). Peptidomics of Neuropeptidergic Tissues of the Tsetse Fly *Glossina morsitans morsitans*. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, **26**(12), 2024-2038.

- Calderón-Fernández, G. M., Moriconi, D. E., Dulbecco, A. B., & Juárez, M. P. (2017). Transcriptome Analysis of the *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) Integument. *Journal of medical entomology*, **54**(6), 1531-1542.
- Campbell, P. M., Newcomb, R. D., Russell, R. J., & Oakeshott, J. G. (1998). Two different amino acid substitutions in the ali-esterase, E3, confer alternative types of organophosphorus insecticide resistance in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **28**(3), 139-150.
- Cancino-Rodezno, A., Lozano, L., Oppert, C., ... Bravo, A. (2012). Comparative proteomic analysis of *Aedes aegypti* larval midgut after intoxication with Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis*. *PLoS ONE*, **7**(5), e37034.
- Cao, C., Sun, L., Wen, R., Shang, Q., Ma, L., & Wang, Z. (2015). Characterization of the transcriptome of the Asian gypsy moth *Lymantria dispar* identifies numerous transcripts associated with insecticide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **119**, 54-61.
- Cao, Y., Yang, Q., Tu, X.-H., Li, S.-G., & Liu, S. (2018). Molecular characterization of a typical 2-Cys thioredoxin peroxidase from the Asiatic rice borer *Chilo suppressalis* and its role in oxidative stress. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **99**(1), e21476.
- Capriotti, N. (2018). Estudio de la resistencia a insecticidas en triatominos y búsqueda de nuevos blancos endocrinos para su control. Universidad Nacional de La Plata.
- Capriotti, N., Mougabure-Cueto, G., Rivera-Pomar, R., & Ons, S. (2014). L925I Mutation in the Para-Type Sodium Channel Is Associated with Pyrethroid Resistance in *Triatoma infestans* from the Gran Chaco Region. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, **8**(1), e2659-.
- Ceballos, L. A., Piccinali, R. V, Berkunsky, I., Kitron, U., & Gürtler, R. E. (2009). First Finding of Melanic Sylvatic *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) Colonies in the Argentine Chaco. *Journal of Medical Entomology*, **46**(5), 1195-1202.
- Chagas, C. (1909). Nova tripanozomíaze humana. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*.
- Champion, C. J., & Xu, J. (2018). Redox state affects fecundity and insecticide susceptibility in *Anopheles gambiae*. *Scientific Reports*, **8**(13054), 1-11.
- Cheng, S., Maier, D., Neubueser, D., & Hipfner, D. R. (2010). Regulation of Smoothed by *Drosophila* G-protein-coupled receptor kinases. *Developmental Biology*, **337**(1), 99-109.
- Christiaens, O., & Smagghe, G. (2014). The challenge of RNAi-mediated control of hemipterans. *Current Opinion in Insect Science*, **6**, 15-21.
- Christie, A. E. (2015). In silico prediction of a neuropeptidome for the eusocial insect *Mastotermes darwiniensis*. *General and Comparative Endocrinology*, **224**, 69-83.
- Clark, A. G., & Shamaan, N. A. (1984). Evidence that DDT-dehydrochlorinase from the house fly is a glutathione S-transferase. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **22**(3), 249-261.
- Claudianos, C., Ranson, H., Johnson, R. M., ... Oakeshott, J. G. (2006). A deficit of detoxification enzymes: Pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Molecular Biology*. doi:10.1111/j.1365-2583.2006.00672.x
- Claudianos, C., Russell, R. J., & Oakeshott, J. G. (1999). The same amino acid substitution in orthologous esterases confers organophosphate resistance on the house fly and a blowfly. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **29**(8), 675-686.

Coast, G. M. (2009). Neuroendocrine control of ionic homeostasis in blood-sucking insects. *Journal of Experimental Biology*, **212**, 378-386.

Cockburn, J. (1972). Laboratory Investigations Bearing on Possible Insecticide Resistance in Triatomid Bugs. Organización Mundial de la Salud. Recuperado a partir de <http://www.who.int/iris/handle/10665/201700>

Cohen, E. (1993). Chitin synthesis and degradation as targets for pesticide action. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **22**(1-2), 245-261.

Comité de expertos en insecticidas de la OMS. (1957). *7th. report of a meeting held in Geneva from 10 to 17 July 1956*, Geneva.

Contreras, E., Rausell, C., & Real, M. D. (2013). Proteome Response of *Tribolium castaneum* Larvae to *Bacillus thuringiensis* Toxin Producing Strains. *PLOS ONE*, **8**(1), e55330-.

Coura, J. R., & Junqueira, A. C. V. (2012). Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon Region. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **107**, 145-154.

Cruz-Reyes, A., & Pickering-López, J. M. (2006). Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years - A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **101**(4), 345-354.

Cuba Cuba, C. A., Abad-Franch, F., Roldán Rodríguez, J., Vargas Vásquez, F., Pollack Velásquez, L., & Miles, M. A. (2002). The Triatomines of Northern Peru, with Emphasis on the Ecology and Infection by Trypanosomes of *Rhodnius ecuadoriensis* (Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **97**(2), 175-183.

Daborn, P. J., Lumb, C., Boey, A., Wong, W., ffrench-Constant, R. H., & Batterham, P. (2007). Evaluating the insecticide resistance potential of eight *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes by transgenic over-expression. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **37**(5), 512-519.

David, J.-P., Coissac, E., Melodelima, C., ... Reynaud, S. (2010). Transcriptome response to pollutants and insecticides in the dengue vector *Aedes aegypti* using next-generation sequencing technology. *BMC Genomics*, **11**(1), 216.

David, J. P., Faucon, F., Chandor-Proust, A., ... Reynaud, S. (2014). Comparative analysis of response to selection with three insecticides in the dengue mosquito *Aedes aegypti* using mRNA sequencing. *BMC Genomics*, **15**, 174.

David, J. P., Strode, C., Vontas, J., ... Ranson, H. (2005). The *Anopheles gambiae* detoxification chip: A highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **102**(11), 4080-4084.

De Azambuja, P., Garcia, E. S., Ratcliffe~, N. A., David, J., & Jr' ', W. (1991). Immune-depression in *Rhodnius prolixus* induced by the growth inhibitor, azadirachtin. *J. Insect Physiol*, **37**(10), 771-777.

de Carvalho, D. B., Congrains, C., Chahad-Ehlers, S., Pinotti, H., Brito, R. A. de, & da Rosa, J. A. (2017). Differential transcriptome analysis supports *Rhodnius montenegrensis* and *Rhodnius robustus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) as distinct species. *PLOS ONE*, **12**(4), e0174997-.

Defferrari, M. S., Lee, D. H., Fernandes, C. L., Orchard, I., & Carlini, C. R. (2014). A phospholipase A2 gene is linked to Jack bean urease toxicity in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **1840**(1), 396-405.

- Depickère, S., Buitrago, R., Siñani, E., ... Brenière, S. F. (2012). Susceptibility and resistance to deltamethrin of wild and domestic populations of *Triatoma infestans* (Reduviidae: Triatominae) in Bolivia: new discoveries. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **107**(8), 1042-1047.
- Dermauw, W., & Van Leeuwen, T. (2014). The ABC gene family in arthropods: Comparative genomics and role in insecticide transport and resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, pp. 89-110.
- Després, L., David, J. P., & Gallet, C. (2007). The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends in Ecology and Evolution*, **22**(6), 298-307.
- Devine, W. P., Lubarsky, B., Shaw, K., Luschnig, S., Messina, L., & Krasnow, M. A. (2005). Requirement for chitin biosynthesis in epithelial tube morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**(47), 17014.
- Dias, J. C. P. (1984). Acute Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **79**, 85-91.
- Dias, J. C. P. (1995). Natural history of Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol*, **65**, 359-66.
- Dias, J. C. P. (2007). Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusion Chagas disease: historical aspects, present situation, and perspectives. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **102**(suppl 1), 11-18.
- Dillies, M. A., Rau, A., Aubert, J., ... Jaffrézic, F. (2013). A comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high-throughput RNA sequencing data analysis. *Briefings in Bioinformatics*, **14**(6), 671-683.
- Doherty, G. J., & McMahon, H. T. (2008). Mediation, Modulation, and Consequences of Membrane-Cytoskeleton Interactions. *Annual Review of Biophysics*, **37**, 65-95.
- Dong, K., Du, Y., Rinkevich, F., ... Zhorov, B. S. (2014). Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **50**, 1-17.
- Donini, A., O'Donnell, M. J., & Orchard, I. (2008). Differential actions of diuretic factors on the Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus*. *Journal of Experimental Biology*, **211**(1), 42.
- Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, **7**(1), 214.
- Dulbecco, A. B., Moriconi, D. E., Calderón-Fernández, G. M., ... Pedrini, N. (2018). Integument CYP genes of the largest genome-wide cytochrome P450 expansions in triatomines participate in detoxification in deltamethrin-resistant *Triatoma infestans*. *Scientific reports*, **8**, 10177.
- Edwards, J. S. (1998). Sir Vincent Wigglesworth and the coming of age of insect development. *International Journal of Developmental Biology*.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., & Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494.
- Enayati, A. A., Ranson, H., & Hemingway, J. (2005). Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*, **14**, 3-8.
- Ewer, J., & Reynolds, S. (2002). Neuropeptide control of molting in insects. En D. Pfaff, A. Arnold, S. Fahrbach, A. Etgen, & R. Rubin, eds., *Hormones, Brain and Behavior*. San Diego: Academic Press, pp. 1-92.

- Fabro, J., Sterkel, M., Capriotti, N., ... Ons, S. (2012). Identification of a point mutation associated with pyrethroid resistance in the para-type sodium channel of *Triatoma infestans*, a vector of Chagas' disease. *Infection, Genetics and Evolution*, **12**(2), 487-491.
- Feyereisen, R. (2005). Insect Cytochrome P450. En *Comprehensive Molecular Insect Science*, Elsevier, pp. 1-77.
- Feyereisen, R. (2006). Evolution of insect P450. *Biochemical Society Transactions*, **34**(6), 1252-1255.
- Feyereisen, R. (2011). Arthropod CYPomes illustrate the tempo and mode in P450 evolution. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, **1814**(1), 19-28.
- Feyereisen, R. (2012). Insect CYP Genes and P450 Enzymes. En L. I. Gilbert, ed., *Insect Molecular Biology and Biochemistry*, Academic Press, pp. 236-316.
- Field, A. P. (2000a). *Discovering Statistics Using SPSS for Windows: Advanced Techniques for Beginners*, Thousand Oaks, CA, USA : Sage Publications, Inc.
- Field, L. M. (2000b). Methylation and expression of amplified esterase genes in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochemical Journal*, **349**(3), 863.
- Field, L. M., & Devonshire, A. L. (1997). Structure and organization of amplicons containing the E4 esterase genes responsible for insecticide resistance in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochemical Journal*, **322**(3), 867.
- Field, M. L., & Devonshire, L. A. (1998). Evidence that the E4 and FE4 esterase genes responsible for insecticide resistance in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer) are part of a gene family. *Biochemical Journal*, **330**(1), 169.
- Finn, R. D., Coghill, P., Eberhardt, R. Y., ... Bateman, A. (2016). The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research*, **44**(D1), D279-D285.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811.
- Flaskos, J. (2014). The neuronal cytoskeleton as a potential target in the developmental neurotoxicity of organophosphorothionate insecticides. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, **115**, 201-208.
- Fournier, B., Guérineau, N., Mollard, P., & Girardie, J. (1994). Effects of two neuronal antidiuretic molecules, neuroparsin and 5-hydroxytryptamine, on cytosolic free calcium monitored with indo-1 in epithelial and muscular cells of the African locust rectum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, **1220**(2), 181-187.
- Friedman, R. (2011). Genomic organization of the glutathione S-transferase family in insects. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **61**(3), 924-932.
- Friggi-Grelín, F., Rabouille, C., & Therond, P. (2006). The cis-Golgi *Drosophila* GMAP has a role in anterograde transport and Golgi organization in vivo, similar to its mammalian ortholog in tissue culture cells. *European Journal of Cell Biology*, **85**(11), 1155-1166.
- Galvão, C., Carcavallo, R., Rocha, D. da S., & Jurberg, J. (2003). A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa*, **202**(1). doi:10.11646/zootaxa.202.1.1

- Galvão, C., & Justi, S. A. (2015). An overview on the ecology of Triatominae (Hemiptera:Reduviidae). *Acta Tropica*, **151**, 116-125.
- García, B. A., Manfredi, C., Fichera, L., & Segura, E. L. (2003). Short report: Variation in mitochondrial 12S and 16S ribosomal DNA sequences in natural populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **68**(6), 692-694.
- Gatehouse, J. A. (2002). Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytologist*, **156**(2), 145-169.
- Gatton, M. L., Chitnis, N., Churcher, T., ... Lindsay, S. W. (2013). The importance of mosquito behavioural adaptations to malaria control in Africa. *Evolution*. doi:10.1111/evo.12063
- Germano, M. D., Acevedo, G. R., Cueto, G. A. M., Toloza, A. C., Vassena, C. V., & Picollo, M. I. (2010). New Findings of Insecticide Resistance in *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) From the Gran Chaco. *Journal of Medical Entomology*, **47**(6), 1077-1081.
- Germano, M. D., Picollo, M. I., & Mougabure-Cueto, G. A. (2013). Microgeographical study of insecticide resistance in *Triatoma infestans* from Argentina. *Acta Tropica*, **128**(3), 561-565.
- Germano, M. D., Santo-Orihuela, P., Roca-Acevedo, G., ... Mougabure-Cueto, G. (2012). Scientific Evidence of Three Different Insecticide-Resistant Profiles in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) Populations From Argentina and Bolivia. *Journal of Medical Entomology*, **49**(6), 1355-1360.
- Germano, M., Picollo, M. I., Spillmann, C., & Mougabure-Cueto, G. (2014). Fenitrothion: an alternative insecticide for the control of deltamethrin-resistant populations of *Triatoma infestans* in northern Argentina. *Medical and Veterinary Entomology*, **28**(1), 21-25.
- Gillingham, A. K., Sinka, R., Torres, I. L., Lilley, K. S., & Munro, S. (2014). Toward a comprehensive map of the effectors of rab GTPases. *Developmental cell*, **31**(3), 358-373.
- Giordano, R., Cortez, J. C. P., Paulk, S., & Stevens, L. (2005). Genetic diversity of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Chuquisaca, Bolivia based on the mitochondrial cytochrome b gene. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **100**(7), 753-760.
- Giraldo-Calderón, G. I., Emrich, S. J., MacCallum, R. M., ... Lawson, D. (2015). VectorBase: an updated bioinformatics resource for invertebrate vectors and other organisms related with human diseases. *Nucleic Acids Research*, **43**(D1), D707-D713.
- Girardie, J., Huet, J.-C., Atay-Kadiri, Z., ... Girardie, A. (1998). Isolation, sequence determination, physical and physiological characterization of the neuroparsins and ovary maturing parsins of *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **28**(9), 641-650.
- Glickman, M. H., & Ciechanover, A. (2002). The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. *Physiological Reviews*. doi:10.1152/physrev.00027.2001
- Gomez, M. B., D'Avila, G. C. P., Orellana, A. L. G., ... Diotaiuti, L. G. (2014). Susceptibility to deltamethrin of wild and domestic populations of *Triatoma infestans* of the Gran Chaco and the Inter-Andean Valleys of Bolivia. *Parasites & Vectors*, **7**(1), 497.
- Gonçalves, L. O., Luciana, M. de O., Grasielle, C. D. P., ... Ruiz, J. C. (2017). Insights from tissue-specific transcriptome sequencing analysis of *Triatoma infestans*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **112**(6), 456-457.

Gonzalez-Audino, P. G., Vassena, C., Barrios, S., Zerba, E., & Picollo, M. I. (2004). Role of enhanced detoxication in a deltamethrin-resistant population of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) from Argentina. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **99**(3), 335-339.

Gonzalez-Valdivieso, F. E., Sanchez Diaz, B., & Nocerino, F. (1971). *Susceptibility of R. prolixus to chlorinated hydrocarbon insecticides in Venezuela*. Recuperado a partir de <http://www.who.int/iris/handle/10665/188269>

Good, R. T., Gramzow, L., Battlay, P., Sztal, T., Batterham, P., & Robin, C. (2014). The Molecular Evolution of Cytochrome P450 Genes within and between *Drosophila* Species. *Genome Biology and Evolution*, **6**(5), 1118–1134.

Goodman, W. G., & Cusson, M. (2012). The Juvenile Hormones. En L. I. Gilbert, ed., *Insect Endocrinology*, San Diego: Academic Press, pp. 310-365.

Graça-Souza, A. V., Maya-Monteiro, C., Paiva-Silva, G. O., ... Oliveira, P. L. (2006). Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **36**(4), 322-335.

Granger, E., McNee, G., Allan, V., & Woodman, P. (2014). The role of the cytoskeleton and molecular motors in endosomal dynamics. *Seminars in cell & developmental biology*, **31**(100), 20-29.

Grosso, C. G., Blariza, M. J., Mougabure-Cueto, G., Picollo, M. I., & García, B. A. (2016). Identification of three cytochrome P450 genes in the Chagas' disease vector *Triatoma infestans*: Expression analysis in deltamethrin susceptible and resistant populations. *Infection, Genetics and Evolution*, **44**, 459-470.

Guedes, R. N. C., Oliveira, E. E., Guedes, N. M. P., Ribeiro, B., & Serrão, J. E. (2006). Cost and mitigation of insecticide resistance in the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Physiological Entomology*. doi:10.1111/j.1365-3032.2005.00479.x

Guengerich, F. P. (2001). Common and Uncommon Cytochrome P450 Reactions Related to Metabolism and Chemical Toxicity. *Chemical Research in Toxicology*, **14**(6), 611-650.

Guhl, F. (2017). Geographical distribution of Chagas disease. En J. Telleria & M. Tibayrenc, eds., *American Trypanosomiasis Chagas Disease*, Second edition, Elsevier, pp. 89-112.

Guhl, F., & Schofield, C. J. (1996). Population genetics and control of triatominae. *Parasitology Today*, **12**(5), 169-170.

Gürtler, R. E. (2009). Sustainability of vector control strategies in the Gran Chaco Region: Current challenges and possible approaches. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **104**(1), 52-59.

Gurtler, R. E., Kitron, U., Cecere, M. C., Segura, E. L., & Cohen, J. E. (2007). Sustainable vector control and management of Chagas disease in the Gran Chaco, Argentina. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**(41), 16194-16199.

Gutiérrez, Y., Santos, H. P., Serrão, J. E., & Oliveira, E. E. (2016). Deltamethrin-mediated toxicity and cytomorphological changes in the midgut and nervous system of the mayfly *Callibaetis radiatus*. *PLoS ONE*, **11**(3), e0152383.

Guzov, V. M., Unnithan, G. C., Chernogolov, A. A., & Feyereisen, R. (1998). CYP12A1, a Mitochondrial Cytochrome P450 from the House Fly. *Arch Biochem Biophys*, **359**(2), 231-240.

Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., ... Regev, A. (2013). De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*, **8**, 1494–1512.

- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-Transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, **249**(22), 7130-7139.
- Hai, D. Q., Varga, S. I., & Matkovics, B. (1997). Organophosphate Effects on Antioxidant System of Carp (*Cyprinus carpio*) and Catfish (*Ictalurus nebulosus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, **117**(1), 83-88.
- Hammond, S. M., Boettcher, S., Caudy, A. A., Kobayashi, R., & Hannon, G. J. (2001). Argonaute2, a Link Between Genetic and Biochemical Analyses of RNAi. *Science*, **293**(5532), 1146.
- Han, G., Li, X., Zhang, T., Zhu, X., Li, J., & Swale, D. (2015). Cloning and tissue-specific expression of a chitin deacetylase gene from *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and Its Response to *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Insect Science*, **15**(1), 95.
- Hansen, K. D., Brenner, S. E., & Dudoit, S. (2010). Biases in Illumina transcriptome sequencing caused by random hexamer priming. *Nucleic Acids Research*, **38**(12), e131.
- Hashimoto, K., & Schofield, C. J. (2012). Elimination of *Rhodnius prolixus* in Central America. *Parasites & Vectors*, **5**, 45.
- Hauser, F., Neupert, S., Williamson, M., Predel, R., Tanaka, Y., & Grimmlikhuijzen, C. J. P. (2010). Genomics and Peptidomics of Neuropeptides and Protein Hormones Present in the Parasitic Wasp *Nasonia vitripennis*. *Journal of Proteome Research*, **9**(10), 5296-5310.
- Hawkes, N. J., & Hemingway, J. (2002). Analysis of the promoters for the β -esterase genes associated with insecticide resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, **1574**(1), 51-62.
- Hayes, T. K., Mark Holman, G., Pannabecker, T. L., ... Beyenbach, K. W. (1994). Culekinin depolarizing peptide: a mosquito leucokinin-like peptide that influences insect Malpighian tubule ion transport. *Regulatory Peptides*, **52**(3), 235-248.
- Hegan, P. S., Mermall, V., Tilney, L. G., & Mooseker, M. S. (2007). Roles for *Drosophila melanogaster* Myosin IB in Maintenance of Enterocyte Brush-Border Structure and Resistance to the Bacterial Pathogen *Pseudomonas entomophila*. *Molecular Biology of the Cell*, **18**, 4625-4636.
- Heidel-Fischer, H. M., & Vogel, H. (2015). Molecular mechanisms of insect adaptation to plant secondary compounds. *Current Opinion in Insect Science*, **8**, 8-14.
- Helvig, C., Koener, J. F., Unnithan, G. C., & Feyereisen, R. (2004). CYP15A1, the cytochrome P450 that catalyzes epoxidation of methyl farnesoate to juvenile hormone III in cockroach corpora allata. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **101**(12), 4024.
- Hemingway, J., Hawkes, N., Prapanthadara, L. A., Jayawardenal, K. G. I., & Ranson, H. (1998). The role of gene splicing, gene amplification and regulation in mosquito insecticide resistance. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **353**(1376), 1695-1699.
- Hewes, R. S., & Taghert, P. H. (2001). Neuropeptides and Neuropeptide Receptors in the *Drosophila melanogaster* Genome. *Genome Res.*, **11**(6), 1126-1142.
- Holman, G. M., Nachman, R. J., & Coast, G. M. (1999). Isolation, characterization and biological activity of a diuretic myokinin neuropeptide from the housefly, *Musca domestica*. *Peptides*, **20**(1), 1-10.

- Hsu, J.-C., Lin, Y.-Y., Chang, C.-C., ... Chen, C.-Y. (2016). Discovery of Organophosphate Resistance-Related Genes Associated With Well-known Resistance Mechanisms of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) by RNA-Seq. *Journal of Economic Entomology*, **109**(3), 1378–1386.
- Hsu, J. C., Chien, T. Y., Hu, C. C., ... Chen, C. Y. (2012). Discovery of genes related to insecticide resistance in *Bactrocera dorsalis* by functional genomic analysis of a De novo assembled transcriptome. *PLoS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0040950
- Huang, H.-S., Hu, N.-T., Yao, Y.-E., Wu, C.-Y., Chiang, S.-W., & Sun, C.-N. (1998). Molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **28**(9), 651-658.
- Hull-Thompson, J., Muffat, J., Sanchez, D., ... Jasper, H. (2009). Control of metabolic homeostasis by stress signaling is mediated by the Lipocalin NLaz. *PLoS Genetics*, **5**(4), e1000460.
- Hummon, A. B., Richmond, T. A., Verleyen, P., ... Sweedler, J. V. (2006). From the Genome to the Proteome: Uncovering Peptides in the *Apis* Brain. *Science*, **314**, 647-649.
- Hunter, W. B., Glick, E., Paldi, N., & Bextine, B. R. (2012). Advances in RNA interference: dsRNA Treatment in Trees and Grapevines for Insect Pest Suppression. *Southwestern Entomologist*, **37**(1), 85-87.
- Hunter, W., Ellis, J., Vanengelsdorp, D., ... Paldi, N. (2010). Large-scale field application of RNAi technology reducing Israeli acute paralysis virus disease in honey bees (*Apis mellifera*, hymenoptera: Apidae). *PLoS Pathogens*, **6**(12), e1001160.
- Huybrechts, J., Bonhomme, J., Minoli, S., ... Tagu, D. (2010). Neuropeptide and neurohormone precursors in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Insect Molecular Biology*, **19**(s2), 87-95.
- Hynes, R. (2002). Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell*, **110**, 673–687.
- Ianowski, J. P., Paluzzi, J.-P., Te Brugge, V. A., & Orchard, I. (2009). The antidiuretic neurohormone RhoprCAPA-2 downregulates fluid transport across the anterior midgut in the blood-feeding insect *Rhodnius prolixus*. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **298**(3), R548-R557.
- Ibarra-Cerdeña, C. N., Sánchez-Cordero, V., Townsend Peterson, A., & Ramsey, J. M. (2009). Ecology of North American Triatominae. *Acta Tropica*, **110**(2-3), 178-186.
- Ilboudo, S., Fouche, E., Rizzati, V., Toé, A. M., Gamet-Payraastre, L., & Guissou, P. I. (2014). In vitro impact of five pesticides alone or in combination on human intestinal cell line Caco-2. *Toxicology Reports*, **1**, 474-489.
- Illumina. (2017). An introduction to Next-Generation Sequencing Technology. Recuperado a partir de https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf
- Ingham, V. A., Wagstaff, S., & Ranson, H. (2018). Transcriptomic meta-signatures identified in *Anopheles gambiae* populations reveal previously undetected insecticide resistance mechanisms. *Nature Communications*. doi:10.1038/s41467-018-07615-x
- Ingles, P. J., Adams, P. M., Knipple, D. C., & Soderlund, D. M. (1996). Characterization of voltage-sensitive sodium channel gene coding sequences from insecticide-susceptible and knockdown-resistant house fly strains. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **26**(4), 319-326.
- Isman, M. B. (2006). Botanical Insecticides, Deterrents, And Repellents In Modern Agriculture And An Increasingly Regulated World. *Annual Review of Entomology*, **51**(1), 45-66.

- James, R. R., & Xu, J. (2012). Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *Journal of Invertebrate Pathology*. doi:10.1016/j.jip.2011.12.005
- Jean, S., Cox, S., Schmidt, E. J., Robinson, F. L., Kiger, A., & Barr, F. A. (2012). Sbf/MTMR13 coordinates PI(3)P and Rab21 regulation in endocytic control of cellular remodeling. *Molecular Biology of the Cell*, **23**(14), 2723-2740.
- Jirajaroenrat, K., Pongjaroenkit, S., Krittanai, C., Prapanthadara, L., & Ketterman, A. J. (2001). Heterologous expression and characterization of alternatively spliced glutathione S-transferases from a single *Anopheles* gene. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **31**(9), 867-875.
- Jones, P., Binns, D., Chang, H.-Y., ... Hunter, S. (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, **30**(9), 1236-1240.
- Kaps, M., & Lamberson, W. R. (2004). *Biostatistics for Animal Science*, UK: CABI Publishing. Recuperado a partir de www.cabi-publishing.org
- Karhunen, T., Vilim, F. S., Alexeeva, V., Weiss, K. R., & Church, P. J. (2001). Targeting of Peptidergic Vesicles in Cotransmitting Terminals. *The Journal of Neuroscience*, **21**(3), RC127.
- Karpova, N., Bobinnec, Y., Fouix, S., Huitorel, P., & Debec, A. (2006). Jupiter, a new *Drosophila* protein associated with microtubules. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, **63**, 301-312.
- Karunaratne, S. H. P. P., Vaughan, A., Paton, M. G., & Hemingway, J. (1998). Amplification of a serine esterase gene is involved in insecticide resistance in Sri Lankan *Culex tritaeniorhynchus*. *Insect Molecular Biology*, **7**(4), 307-315.
- Kasai, S., Komagata, O., Itokawa, K., ... Tomita, T. (2014). Mechanisms of Pyrethroid Resistance in the Dengue Mosquito Vector, *Aedes aegypti*: Target Site Insensitivity, Penetration, and Metabolism. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **8**(6), e2948.
- Kasai, S., & Scott, J. G. (2001). Expression and regulation of CYP6D3 in the house fly, *Musca domestica* (L.). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **32**(1), 1-8.
- Kato, H., Jochim, R. C., Gomez, E. A., ... Hashiguchi, Y. (2010). A repertoire of the dominant transcripts from the salivary glands of the blood-sucking bug, *Triatoma dimidiata*, a vector of Chagas disease. *Infection, Genetics and Evolution*, **10**(2), 184-191.
- Kennedy, C. J., & Tierney, K. B. (2013). Xenobiotic Protection/Resistance Mechanisms in Organisms. En E. A. Laws, ed., *Environmental Toxicology: Selected Entries from the Encyclopedia of Sustainability Science and Technology*, New York, NY: Springer New York, pp. 689-721.
- Killiny, N., Hajeri, S., Tiwari, S., Gowda, S., & Stelinski, L. L. (2014). Double-stranded RNA uptake through topical application, mediates silencing of five CYP4 genes and suppresses insecticide resistance in *Diaphorina citri*. *PLoS ONE*, **9**(10), e110536.
- Kim, E., Park, Y., Kim, Y., & Ling, E. (2015). A transformed bacterium expressing double-stranded RNA specific to integrin $\beta 1$ enhances Bt Toxin efficacy against a polyphagous insect pest, *Spodoptera exigua*. *PLoS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0132631
- Klotz, J. H., Dorn, P. L., Logan, J. L., ... Klotz, S. A. (2010). "Kissing Bugs": Potential Disease Vectors and Cause of Anaphylaxis. *Clinical Infectious Diseases*, **50**(12), 1629-1634.
- Koch, I., Schwarz, H., Beuchle, D., Goellner, B., Langeegger, M., & Aberle, H. (2008). *Drosophila* Ankyrin 2 Is Required for Synaptic Stability. *Neuron*, **58**, 210-222.

- Kodrik, D. (2008). Adipokinetic hormone functions that are not associated with insect flight. *Physiological Entomology*, **33**(3), 171-180.
- Kodrik, D., Bednářová, A., Zemanová, M., & Krishnan, N. (2015). Hormonal regulation of response to oxidative stress in insects—an update. *International Journal of Molecular Sciences*, **16**(10), 25788-25816.
- Kolhekar, A. S., Roberts, M. S., Jiang, N., ... Taghert, P. H. (1997). Neuropeptide Amidation in *Drosophila*: Separate Genes Encode the Two Enzymes Catalyzing Amidation. *The Journal of Neuroscience*, **17**(4), 1363.
- Koonin, E. V., Tatusov, R. L., & Galperin, M. Y. (1998). Beyond complete genomes: From sequence to structure and function. *Current Opinion in Structural Biology*, **8**(3), 355-363.
- Koppenhöfer, A. M., Brown, I. M., Gaugler, R., Grewal, P. S., Kaya, H. K., & Klein, M. G. (2000). Synergism of Entomopathogenic Nematodes and Imidacloprid against White Grubs: Greenhouse and Field Evaluation. *Biological Control*, **19**(3), 245-251.
- Kostaropoulos, I., Papadopoulos, A. I., Metaxakis, A., Boukouvala, E., & Papadopoulou-Mourkidou, E. (2001). Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. doi:10.1016/S0965-1748(00)00123-5
- Kramer, K. J., & Muthukrishnan, S. (1997). Insect Chitinases: Molecular Biology and Potential Use as Biopesticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **27**(11), 887-900.
- Kreisköther, N., Reichert, N., Buttgereit, D., Hertenstein, A., Fischbach, K., & Renkawitz-Pohl, R. (2006). *Drosophila* Rolling pebbles colocalises and putatively interacts with alpha-Actinin and the Sls isoform Zormin in the Z-discs of the sarcomere and with Dumbfounded/Kirre, alpha-Actinin and Zormin in the terminal Z-discs. *Journal of Muscle Research & Cell Motility*, **27**(1), 93.
- Kültz, D. (2005). Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annual Review of Physiology*, **67**, 225–57.
- Lammel, U., Bechtold, M., Risse, B., ... Bogdan, S. (2014). The *Drosophila* FHOD1-like formin Knittrig acts through Rok to promote stress fiber formation and directed macrophage migration during the cellular immune response. *Development*, **141**, 1366-1380.
- Lange, A., Alim, U., Vandersmissen, H. P., Mizoguchi, A., Vanden Broeck, J., & Orchard, I. (2012). The Distribution and Physiological Effects of the Myoinhibiting Peptides in the Kissing Bug, *Rhodnius prolixus*. *Frontiers in Neuroscience*, **6**, 98.
- Laranja, F. S., Dias, E., Nobrega, G., & Miranda, A. (1956). Chagas Disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. *Circulation*, **14**(6), 1035.
- Lardeux, F., Depickère, S., Duchon, S., & Chavez, T. (2010). Insecticide resistance of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) vector of Chagas disease in Bolivia. *Tropical Medicine and International Health*, **15**, 1037-1048.
- Larosa, V., & Remacle, C. (2018). Insights into the respiratory chain and oxidative stress. *Bioscience reports*, **38**(5), BSR20171492.
- Latorre-Estivalis, J. M., Robertson, H. M., Walden, K. K. O., ... Lorenzo, M. G. (2017). The molecular sensory machinery of a Chagas disease vector: Expression changes through imaginal moult and sexually dimorphic features. *Scientific Reports*. doi:10.1038/srep40049
- Lavara-Culebras, E., & Paricio, N. (2007). *Drosophila* DJ-1 mutants are sensitive to oxidative stress and show reduced lifespan and motor deficits. *Gene*, **400**(1-2), 158-165.

- Lavore, A., Perez-Gianmarco, L., Esponda-Behrens, N., ... Ons, S. (2018). *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) transcriptomic analysis and neuropeptidomics OPEN. *Scientific Reports*, **8**(17244). doi:10.1038/s41598-018-35386-4
- Lee, S. H., Kim, Y. H., Kwon, D. H., Cha, D. J., & Kim, J. H. (2015). Mutation and duplication of arthropod acetylcholinesterase: Implications for pesticide resistance and tolerance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **120**, 118-124.
- Lent, H., & Wygodzinsky, P. (1979). Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' Disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, **163**(3).
- Lertcanawanichakul, M., Wiwat, C., Bhumiratana, A., & Dean, D. H. (2004). Expression of Chitinase-Encoding Genes in *Bacillus thuringiensis* and Toxicity of Engineered *B. thuringiensis* subsp. aizawai Toward *Lymantria dispar* Larvae. *Current Microbiology*, **48**(3), 175-181.
- Letunic, I., & Bork, P. (2016). Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Research*, **44**(W1), W242-W245.
- Li, X., Schuler, M. A., & Berenbaum, M. R. (2007). Molecular Mechanisms of Metabolic Resistance to Synthetic and Natural Xenobiotics. *Annual Review of Entomology*, **52**(1), 231-253.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-(delta delta Ct) Method. *METHODS*, **25**, 402-408.
- Lopes, K. V. G., Silva, L. B., Reis, A. P., Oliveira, M. G. A., & Guedes, R. N. C. (2010). Modified α -amylase activity among insecticide-resistant and -susceptible strains of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Journal of Insect Physiology*. doi:10.1016/j.jinsphys.2010.02.020
- Lumjuan, N., McCarroll, L., Prapanthadara, L., Hemingway, J., & Ranson, H. (2005). Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **35**(8), 861-871.
- Lv, Y., Wang, W., Hong, S., ... Zhu, C. (2016). Comparative transcriptome analyses of deltamethrin-susceptible and -resistant *Culex pipiens pallens* by RNA-seq. *Molecular Genetics and Genomics*, **291**(1), 309–321.
- Ma, Z., Liu, Z., & Huang, X. (2012). Membrane phospholipid asymmetry counters the adverse effects of sterol overloading in the Golgi membrane of *Drosophila*. *Genetics*, **190**(4), 1299-1308.
- Maddrell, S. H. P. (1962). A Diuretic Hormone in *Rhodnius prolixus* Stål. *Nature*, **194**, 605.
- Maddrell, S. H. P. (1964). Excretion in the Blood-Sucking Bug, *Rhodnius prolixus* Stål III. *Journal of Experimental Biology*, **41**(3), 459.
- Maïbèche-Coisne, M., Merlin, C., François, M.-C., Porcheron, P., & Jacquín-Joly, E. (2005). P450 and P450 reductase cDNAs from the moth *Mamestra brassicae*: cloning and expression patterns in male antennae. *Gene*, **346**, 195-203.
- Maïbèche-Coisne, M., Jacquín-Joly, E., François, M. C., & P, N. M. (2002). cDNA cloning of biotransformation enzymes belonging to the cytochrome P450 family in the antennae of the noctuid moth *Mamestra brassicae*. *Insect Molecular Biology*, **11**(3), 273-281.
- Maïbèche-Coisne, M., Monti-Dedieu, L., Aragon, S., & Dauphin-Villemant, C. (2000). A New Cytochrome P450 from *Drosophila melanogaster*, CYP4G15, Expressed in the Nervous System. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **273**(3), 1132-1137.

- Majerowicz, D., Alves-Bezerra, M., Logullo, R., ... Gondim, K. C. (2011). Looking for reference genes for real-time quantitative PCR experiments in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Molecular Biology*. doi:10.1111/j.1365-2583.2011.01101.x
- Mallet, J. (1989). The evolution of insecticide resistance: Have the insects won? *Trends in Ecology & Evolution*, **4**(11), 336-340.
- Mamidala, P., Wijeratne, A. J., Wijeratne, S., ... Mittapalli, O. (2012). RNA-Seq and molecular docking reveal multi-level pesticide resistance in the bed bug. *BMC Genomics*, **13**, 6.
- Mansuy, D. (1998). The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.*, **121**(1-3), 5-14.
- Mantione, K. J., Kream, R. M., Kuzelova, H., ... Stefano, G. B. (2014). Comparing Bioinformatic Gene Expression Profiling Methods: Microarray and RNA-Seq. *Medical Science Monitor Basic Research*. doi:10.12659/MSMBR.892101
- Mao, Y.-B., Cai, W.-J., Wang, J.-W., ... Chen, X.-Y. (2007). Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature Biotechnology*, **25**, 1307.
- Marcet, P. L., Mora, M. S., Cutrera, A. P., ... Dotson, E. M. (2008). Genetic structure of *Triatoma infestans* populations in rural communities of Santiago del Estero, Northern Argentina. *Infection, genetics and evolution: Journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, **8**(6), 835-846.
- Marchal, E., Vandersmissen, H. P., Badisco, L., ... Vanden Broeck, J. (2010). Control of ecdysteroidogenesis in prothoracic glands of insects: A review. *Peptides*, **31**(3), 506-519.
- Marchant, A., Mougél, F., Almeida, C., Jacquín-Joly, E., Costa, J., & Harry, M. (2015). De novo transcriptome assembly for a non-model species, the blood-sucking bug *Triatoma brasiliensis*, a vector of Chagas disease. *Genetica*, **143**(2), 225-239.
- Marchant, A., Mougél, F., Jacquín-Joly, E., Costa, J., Almeida, C. E., & Harry, M. (2016). Under-Expression of Chemosensory Genes in Domiciliary Bugs of the Chagas Disease Vector *Triatoma brasiliensis*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, **10**(10), e0005067-.
- Marco, H. G., Šimek, P., Clark, K. D., & Gäde, G. (2013). Novel adipokinetic hormones in the kissing bugs *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans*, *Dipetalogaster maxima* and *Panstrongylus megistus*. *Peptides*, **41**, 21-30.
- Martínez-Barnette, J., Lavore, A., Beliera, M., ... Rodríguez, M. H. (2018). Adaptations in energy metabolism and gene family expansions revealed by comparative transcriptomics of three Chagas disease triatomine vectors. *BMC Genomics*, **19**, 296.
- McCarthy, D. J., Chen, Y., & Smyth, G. K. (2012). Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Research*, **40**(10), 4288-4297.
- McCleery, R. H., Watt, T. A., & Hart, T. (2007). *Introduction to Statistics for Biology*, Third Edition, CRC Press.
- Mehlhase, J., & Grune, T. (2002). Proteolytic Response to Oxidative Stress in Mammalian Cells. *Biol. Chem.*, **383**, 559-567.

- Melander, A. L. (1914). Can Insects Become Resistant to Sprays? *Journal of Economic Entomology*, **7**(April), 167-173.
- Menzies, F. M., Yenissetti, S. C., & Min, K.-T. (2005). Roles of *Drosophila* DJ-1 in Survival of Dopaminergic Neurons and Oxidative Stress. *Current Biology*, **15**(17), 1578-1582.
- MERCOSUR. (1991). *Reunión de Ministros de Salud del MERCOSUR. Resolución No.04-3-CS.*, Brasilia.
- Mesquita, R. D., Vionette-Amaral, R. J., Lowenberger, C., ... Oliveira, P. L. (2015). Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112**(48), 14936-14941.
- Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. En *2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, pp. 1-8.
- Miller, T. A. (1988). Mechanisms of resistance to pyrethroid insecticides. *Parasitology Today*, **4**(7), S8-S12.
- Mitchell, N., Cranna, N., Richardson, H., & Quinn, L. (2008). The Ecdysone-inducible zinc-finger transcription factor Crol regulates Wg transcription and cell cycle progression in *Drosophila*. *Development*, **135**, 2707-2716.
- Moncayo, & Silveira, A. C. (2017). Current epidemiological trends of Chagas disease in Latin America and future challenges: Epidemiology, surveillance, and health policies. En *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition*. doi:10.1016/B978-0-12-801029-7.00004-6
- Monteiro, F. A., Escalante, A. A., & Beard, C. B. (2001). Molecular tools and triatomine systematics: a public health perspective. *Trends in Parasitology*, **17**(7), 344-347.
- Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L., & Wold, B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*, **5**, 621.
- Mougabure-Cueto, G. (2004). Caracterización de la resistencia a insecticidas piretroides en *Pediculus humanus capitis* De Geer 1778 (Phthiraptera: Pediculidae): estudio comparativo entre estados embrionarios y post-embrionarios. Universidad de Buenos Aires.
- Mougabure-Cueto, G., & Picollo, M. I. (2015). Insecticide resistance in vector Chagas disease: Evolution, mechanisms and management. *Acta Tropica*, **149**, 70-85.
- Mounier, N., & Arrigo, A. P. (2002). Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: How do they interact? *Cell Stress and Chaperones*, **7**(2), 167-176.
- Mukherjee, A., Veraksa, A., Bauer, A., Rosse, C., Camonis, J., & Artavanis-Tsakonas, S. (2005). Regulation of Notch signalling by non-visual β -arrestin. *Nature Cell Biology*, **7**, 1191.
- Mury, F. B., da Silva, J. R., Ferreira, L. S., ... Dansa-Petretski, M. (2009). Alpha-Glucosidase Promotes Hemozoin Formation in a Blood-Sucking Bug: An Evolutionary History. *PLOS ONE*, **4**(9), e6966-.
- Nachman, R. J., Hamshou, M., Kaczmarek, K., Zabrocki, J., & Smagghe, G. (2012). Biostable and PEG polymer-conjugated insect pyrokinin analogs demonstrate antifeedant activity and induce high mortality in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphidae). *Peptides*, **34**(1), 266-273.

- Nachman, R. J., Mahdian, K., Nässel, D. R., Isaac, R. E., Pryor, N., & Smagghe, G. (2011). Biostable multi-Aib analogs of tachykinin-related peptides demonstrate potent oral aphicidal activity in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphidae). *Peptides*, **32**(3), 587-594.
- Nagalakshmi, U., Wang, Z., Waern, K., ... Snyder, M. (2008). The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science*. doi:10.1126/science.1158441
- Namiki, T., Niwa, R., Higuchi, A., Yoshiyama, T., Mita, K., & Kataoka, H. (2009). A Basic-HLH Transcription Factor, HLH54F, Is Highly Expressed in the Prothoracic Gland in the Silkworm *Bombyx mori* and the Fruit Fly *Drosophila melanogaster*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **73**(3), 762-765.
- Nässel, D. R. (2002). Neuropeptides in the nervous system of *Drosophila* and other insects: Multiple roles as neuromodulators and neurohormones. *Progress in Neurobiology*, **68**(1), 1-84.
- Nässel, D. R., Enell, L. E., Santos, J. G., Wegener, C., & Johard, H. A. D. (2008). A large population of diverse neurons in the Drosophilacentral nervous system expresses short neuropeptide F, suggesting multiple distributed peptide functions. *BMC Neuroscience*, **9**(1), 90.
- Nässel, D. R., & Homberg, U. (2006). Neuropeptides in interneurons of the insect brain. *Cell and Tissue Research*, **326**, 1.
- Nässel, D. R., & Wegener, C. (2011). A comparative review of short and long neuropeptide F signaling in invertebrates: Any similarities to vertebrate neuropeptide Y signaling? *Peptides*, **32**(6), 1335-1355.
- Nässel, D. R., & Winther, Å. M. E. (2010). *Drosophila* neuropeptides in regulation of physiology and behavior. *Progress in Neurobiology*, **92**(1), 42-104.
- Nature. (2010). Who, how, what and where? *Nature*, **465**, S8-S9.
- Nei, M., & Rooney, A. P. (2005). Concerted and Birth-and-Death Evolution of Multigene Families. *Annual Review of Genetics*, **39**, 121-152.
- Nelson, D. (1998). Cytochrome P450 Nomenclature. En I. R. Phillips & E. A. Shephard, eds., *Cytochrome P450 Protocols*, Totowa, NJ: Humana Press, pp. 15-24.
- Nikou, D., Ranson, H., & Hemingway, J. (2003). An adult-specific CYP6 P450 gene is overexpressed in a pyrethroid-resistant strain of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Gene*, **318**, 91-102.
- Niwa, R., Matsuda, T., Yoshiyama, T., ... Kataoka, H. (2004). CYP306A1, a Cytochrome P450 Enzyme, Is Essential for Ecdysteroid Biosynthesis in the Prothoracic Glands of *Bombyx* and *Drosophila*. *Journal of Biological Chemistry*, **279**(34), 35942-35949.
- Nocerino, F. (1975). Insecticide Susceptibility of *Rhodnius prolixus* and *Triatoma macúlala* in Venezuela. Organización Mundial de la Salud. Recuperado a partir de <http://www.who.int/iris/handle/10665/201701>
- Noireau, F., Bastrenta, B., Catalá, S., ... Jurberg, J. (2000). Sylvatic population of *Triatoma infestans* from the Bolivian Chaco: from field collection to characterization. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **95**(suppl 1), 119-122.
- Noireau, F., Cortez, M. G. R., Monteiro, F. A., Jansen, A. M., & Torrico, F. (2005). Can wild *Triatoma infestans* foci in Bolivia jeopardize Chagas disease control efforts? *Trends in Parasitology*, **21**(1), 7-10.
- Oakeshott, J. G., Claudianos, C., Russell, R. J., & Robin, G. C. (1999). Carboxyl/cholinesterases: a case study of the evolution of a successful multigene family. *BioEssays*, **21**(12), 1031-1042.

- Oakeshott, J. G., Claudianos, C., Campbell, P. M., Newcomb, R. D., & Russell, R. J. (2005). Biochemical Genetics and Genomics of Insect Esterases. En *Comprehensive Molecular Insect Science*. doi:10.1016/B0-44-451924-6/00073-9
- Oakeshott, J. G., Johnson, R. M., Berenbaum, M. R., Ranson, H., Cristino, A. S., & Claudianos, C. (2010). Metabolic enzymes associated with xenobiotic and chemosensory responses in *Nasonia vitripennis*. *Insect Molecular Biology*, 19(1), 147-163.
- Obsilova, V., Kopecka, M., Kosek, D., ... Obsil, T. (2014). Mechanisms of the 14-3-3 protein function: Regulation of protein function through conformational modulation. *Physiological Research*, 63(Suppl 1), S155-S164.
- Oliver, S. V., & Brooke, B. D. (2016). The Role of Oxidative Stress in the Longevity and Insecticide Resistance Phenotype of the Major Malaria Vectors *Anopheles arabiensis* and *Anopheles funestus*. *PLOS ONE*, 11(3), e0151049-.
- OMS. (1998). 51st World Health Assembly, Resolution WHA51.14.
- OMS/CIPEIN. (1994). Protocolo de evaluación de efecto insecticida en *Triatoma infestans*.
- OMS/TDR. (2006). *Report of the scientific group on chagas disease*, Geneva-Buenos Aires.
- OMS. (1994). Chagas disease, elimination of transmission in Uruguay. *Wkly Epidemiol Rec*, 6, 38-40.
- OMS. (2000a). Chagas disease, Chile: Certification of interruption of transmission. *Weekly Epidemiological Record*, 75(02), 10-12.
- OMS. (2000b). Chagas disease: Interruption of transmission in Brazil. *Wkly Epidemiol Rec*, 19, 153-155.
- OMS. (2002). *Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee.*, Geneva.
- OMS. (2012). *Handbook for integrated vector management*, Geneva: WHO Press.
- OMS. (2016). *Global Health Estimates 2015: Burden of disease by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2015.*, Geneva.
- Ons, S. (2017). Neuropeptides in the regulation of *Rhodnius prolixus* physiology. *Journal of Insect Physiology*, 97, 77-92.
- Ons, S., Lavore, A., Sterkel, M., ... Rivera-Pomar, R. (2016). Identification of G protein coupled receptors for opsines and neurohormones in *Rhodnius prolixus*. Genomic and transcriptomic analysis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 69, 34-50.
- Ons, S., Sterkel, M., Diambra, L., Urlaub, H., & Rivera-Pomar, R. (2010). Neuropeptide precursor gene discovery in the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. *Insect Molecular Biology*, 20(1), 29-44.
- Oppenoorth, F. J. (1984). Biochemistry of insecticide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 22(2), 187-193.
- Oppenoorth, F. J., & Welling, W. (1976). Biochemistry and Physiology of Resistance. En C. F. Wilkinson, ed., *Insecticide Biochemistry and Physiology*, Boston, MA: Springer US, pp. 507-551.

Oppert, B., Dowd, S. E., Bouffard, P., ... Jurat-Fuentes, J. L. (2012). Transcriptome profiling of the intoxication response of *Tenebrio molitor* larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa protoxin. *PLoS one*, **7**(4), e34624.

OPS. (2006a). *Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas.*, Montevideo.

OPS. (2006b). *XVa Reunión de la Comisión Intergubernamental del Cono Sur para la Eliminación de Triatoma infestans y la Interrupción de la Transmisión de Tripanosomiasis Transfusional (INCOSUR-Chagas)*, Brasilia. Recuperado a partir de <http://www1.paho.org/english/ad/dpc/cd/dch-incosur-xv.htm>

OPS. (2018). Paraguay logró interrumpir la transmisión vectorial domiciliar de la enfermedad de Chagas. Recuperado a partir de https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=14546:paraguay-logro-interrumpir-la-transmision-vectorial-domiciliar-de-la-enfermedad-de-chagas&Itemid=135&lang=es

Orchard, I., Lee, D. H., Da Silva, R., & Lange, A. (2011). The Proctolin Gene and Biological Effects of Proctolin in the Blood-Feeding Bug, *Rhodnius prolixus*. *Frontiers in Endocrinology*, **2**, 59.

Oshlack, A., Robinson, M. D., & Young, M. D. (2010). From RNA-seq reads to differential expression results. *Genome Biology*, **11**(220), 1-10.

Otali, D., Novak, R. J., Wan, W., Bu, S., Moellering, D. R., & De Luca, M. (2014). Increased production of mitochondrial reactive oxygen species and reduced adult life span in an insecticide-resistant strain of *Anopheles gambiae*. *Bulletin of Entomological Research*, **104**(3), 323-333.

Paim, R. M. M., Araujo, R. N., Lehane, M. J., Gontijo, N. F., & Pereira, M. H. (2013). Long-term effects and parental RNAi in the blood feeder *Rhodnius prolixus* (Hemiptera; Reduviidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **43**(11), 1015-1020.

Paluzzi, J.-P., & Orchard, I. (2010). A second gene encodes the anti-diuretic hormone in the insect, *Rhodnius prolixus*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **317**(1-2), 53-63.

Paluzzi, J.-P., Russell, W. K., Nachman, R. J., & Orchard, I. (2008). Isolation, Cloning, and Expression Mapping of a Gene Encoding an Antidiuretic Hormone and Other CAPA-Related Peptides in the Disease Vector, *Rhodnius prolixus*. *Endocrinology*, **149**(9), 4638-4646.

Paluzzi, J.-P. V. (2012). Anti-diuretic factors in insects: The role of CAPA peptides. *General and Comparative Endocrinology*, **176**(3), 300-308.

Paluzzi, J.-P. V., Haddad, A. S., Sedra, L., Orchard, I., & Lange, A. B. (2015). Functional characterization and expression analysis of the myoinhibiting peptide receptor in the Chagas disease vector, *Rhodnius prolixus*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **399**, 143-153.

Patel, H., Orchard, I., Veenstra, J. A., & Lange, A. B. (2014). The distribution and physiological effects of three evolutionarily and sequence-related neuropeptides in *Rhodnius prolixus*: Adipokinetic hormone, corazonin and adipokinetic hormone/corazonin-related peptide. *General and Comparative Endocrinology*, **195**, 1-8.

Patro, R., Duggal, G., Love, M. I., Irizarry, R. A., & Kingsford, C. (2017). Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature Methods*, **14**(4), 417-426.

Pavlidis, N., Vontas, J., & Van Leeuwen, T. (2018). The role of glutathione S-transferases (GSTs) in insecticide resistance in crop pests and disease vectors. *Current Opinion in Insect Science*. doi:10.1016/j.cois.2018.04.007

- Pedrini, N., Mijailovsky, S. J., Girotti, J. R., ... Juárez, M. P. (2009). Control of pyrethroid-resistant chagas disease vectors with entomopathogenic fungi. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **3**(5), e434.
- Pérez de Rosas, A. R., Segura, E. L., & García, B. A. (2007). Microsatellite analysis of genetic structure in natural *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Argentina: its implication in assessing the effectiveness of Chagas' disease vector control programmes. *Molecular Ecology*, **16**(7), 1401-1412.
- Pevzner, P. A., Tang, H., & Waterman, M. S. (2001). An Eulerian path approach to DNA fragment assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. doi:10.1073/pnas.171285098
- Piccinali, R. V., Marcet, P. L., Noireau, F., Kitron, U., Gürtler, R. E., & Dotson, E. M. (2009). Molecular Population Genetics and Phylogeography of the Chagas Disease Vector *Triatoma infestans* in South America. *Journal of Medical Entomology*, **46**(4), 796-809.
- Picollo, M., Vassena, C., Santo-Orihuela, P., Barrios, S., Zaidemberg, M., & Zerba, E. (2005). High Resistance to Pyrethroid Insecticides Associated with Ineffective Field Treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. *J. Med. Entomol*, **42**(4), 637-642.
- Pielage, J., Cheng, L., Fetter, R. D., Carlton, P. M., Sedat, J. W., & Davis, G. W. (2008). A Presynaptic Giant Ankyrin Stabilizes the NMJ through Regulation of Presynaptic Microtubules and Transsynaptic Cell Adhesion. *Neuron*, **58**, 195-209.
- Pinto, A. Y., Ferreira, A. G. J., Valente, V. C., Harada, G. S., & Valente, S. A. (2009). Urban outbreak of acute Chagas disease in Amazon region of Brazil: four-year follow-up after treatment with benznidazole. *Rev Panam Salud Publica*, **25**(1), 77-83.
- Pittendrigh, B., Aronstein, K., Zinkovsky, E., ... Ffrench-Constant, R. H. (1997). Cytochrome P450 genes from *Helicoverpa armigera*: Expression in a pyrethroid-susceptible and -resistant strain. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **27**(6), 507-512.
- Ponce, C. (2007). Current situation of Chagas disease in Central America. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **102**(suppl 1), 41-44.
- Pottier, M. A., Bozzolan, F., Chertemps, T., ... Maïbèche-Coisne, M. (2012). Cytochrome P450s and cytochrome P450 reductase in the olfactory organ of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis*. *Insect Molecular Biology*, **21**(6), 568-580.
- Prabhu, K. S., Reddy, P. V, Gumprich, E., ... Reddy, C. C. (2001). Microsomal glutathione S-transferase A1-1 with glutathione peroxidase activity from sheep liver: molecular cloning, expression and characterization. *Biochemical Journal*, **360**(2), 345.
- Prapanthadara, L., Ranson, H., Somboon, P., & Hemingway, J. (1998). Cloning, expression and characterization of an insect class I glutathione S-transferase from *Anopheles dirus* species B. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **28**(5-6), 321-329.
- Predel, R., Brandt, W., Kellner, R., Rapus, J., Nachman, R. J., & Gäde, G. (1999). Post-translational modifications of the insect sulfakinins. *European Journal of Biochemistry*, **263**(2), 552-560.
- Predel, R., Neupert, S., Derst, C., Reinhardt, K., & Wegener, C. (2018). Neuropeptidomics of the Bed Bug *Cimex lectularius*. *Journal of Proteome Research*, **17**(1), 440-454.
- Predel, R., Wegener, C., Russell, W. K., Tichy, S. E., Russell, D. H., & Nachman, R. J. (2004). Peptidomics of CNS-associated neurohemal systems of adult *Drosophila melanogaster*: A mass spectrometric survey of peptides from individual flies. *Journal of Comparative Neurology*, **474**(3), 379-392.

- Pridgeon, J. W., Zhang, L., & Liu, N. (2003). Overexpression of CYP4G19 associated with a pyrethroid-resistant strain of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Gene*, **314**, 157-163.
- Quintela, E. D., & McCoy, C. W. (1997). Pathogenicity Enhancement of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to First Instars of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) with Sublethal Doses of Imidacloprid. *Environmental Entomology*, **26**(5), 1173-1182.
- Radford, J. C., Terhzaz, S., Cabrero, P., Davies, S.-A., & Dow, J. A. T. (2004). Functional characterisation of the *Anopheles* leucokinins and their cognate G-protein coupled receptor. *Journal of Experimental Biology*, **207**(26), 4573.
- Ramsey, J. S., Rider, D. S., Walsh, T. K., ... Jander, G. (2010). Comparative analysis of detoxification enzymes in *Acyrtosiphon pisum* and *Myzus persicae*. *Insect Molecular Biology*, **19**(s2), 155-164.
- Rane, R. V., Walsh, T. K., Pearce, S. L., ... Oakeshott, J. G. (2016). Are feeding preferences and insecticide resistance associated with the size of detoxifying enzyme families in insect herbivores? *Current Opinion in Insect Science*. doi:10.1016/j.cois.2015.12.001
- Ranson, H., Claudianos, C., Ortell, F., ... Feyereisen, R. (2002). Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science*, **298**(5591), 179-181.
- Ranson, H., Rossiter, L., Ortell, F., ... Hemingway, J. (2001). Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem. J*, **359**, 295-304.
- Rasmussen, M., Leander, M., Ons, S., & Nichols, R. (2015). Conserved molecular switch interactions in modeled cardioactive RF-NH2 peptide receptors: Ligand binding and activation. *Peptides*, **71**, 259-267.
- Rassi, A., & Luquetti, A. O. (1992). Therapy of Chagas disease. En S. Wendel, Z. Brener, M. Camargo, & A. Rassi, eds., *Chagas disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine.*, São Paulo, pp. 237-47.
- Rassi, A., Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *The Lancet*, **375**(9723), 1388-1402.
- Raymond, M., Chevillon, C., Guillemaud, T., Lenormand, T., & Pasteur, N. (1998). An overview of the evolution of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **353**(1376), 1707-1711.
- Reid, W. R., Zhang, L., Gong, Y., Li, T., & Liu, N. (2018). Gene expression profiles of the Southern house mosquito *Culex quinquefasciatus* during exposure to permethrin. *Insect Science*. doi:10.1111/1744-7917.12438
- Reid, W. R., Zhang, L., Liu, F., & Liu, N. (2012). The Transcriptome Profile of the Mosquito *Culex quinquefasciatus* following Permethrin Selection. *PLoS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0047163
- Ribeiro, J. M. C., Assumpção, T. C. F., Pham, V. A. N. M., Francischetti, I. V. O. M. B., & Reisenman, C. E. (2012). An Insight Into the Sialotranscriptome of *Triatoma rubida* (Hemiptera: Heteroptera). *Journal of medical entomology*, **49**(3), 563-572.
- Ribeiro, J. M. C., Genta, F. A., Sorgine, M. H. F., ... Oliveira, P. L. (2014). An Insight into the Transcriptome of the Digestive Tract of the Bloodsucking Bug, *Rhodnius prolixus*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **8**(1), e2594.
- Riggs, B., Rothwell, W., Mische, S., ... Sullivan, W. (2003). Actin cytoskeleton remodeling during early *Drosophila* furrow formation requires recycling endosomal components Nuclear-fallout and Rab11. *The Journal of Cell Biology*, **163**(1), 143.

- Rinker, D. C., Pitts, R. J., & Zwiebel, L. J. (2016). Disease vectors in the era of next generation sequencing. *Genome Biology*, **17**, 95.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2009). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, **26**(1), 139-140.
- Robinson, M. D., & Oshlack, A. (2010). A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biology*, **11**, R25.
- Roca-Acevedo, G., Picollo, M. I., & Santo-Orihuela, P. (2013). Expression of Insecticide Resistance in Immature Life Stages of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology*, **50**(4), 816-818.
- Rogers, M. E., Jani, M. K., & Vogt, R. G. (1999). An olfactory-specific glutathione-S-transferase in the sphinx moth *Manduca sexta*. *The Journal of Experimental Biology*, **202**(12), 1625.
- Roller, L., Žitňanová, I., Dai, L., ... Žitňan, D. (2010). Ecdysis triggering hormone signaling in arthropods. *Peptides*, **31**(3), 429-441.
- Roma, G. C., Camargo-Mathias, M. I., de Oliveira, P. R., Furquim, K. C. S., & Bechara, G. H. (2013). Neurotoxic action of permethrin in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) female ticks. Morphological and cytochemical evaluation of the central nervous system. *Veterinary Parasitology*, **196**(3-4), 482-491.
- Ruegg, R. P., & Davey, K. G. (1979). The effect of c18 juvenile hormone and altosid on the efficiency of egg production in *Rhodnius prolixus*. *International Journal of Invertebrate Reproduction*, **1**(1), 3-8.
- Santo Orihuela, P. L., Picollo, M. I., Audino, P. G., Barrios, S., Zerba, E., & Masuh, H. (2006). 7-Coumaryl permethrate and its cis- and trans-isomers as new fluorescent substrates for examining pyrethroid- cleaving enzymes. *Pest Management Science*, **62**(11), 1039-1044.
- Santo Orihuela, P. L., Vassena, C. V, Zerba, E. N., & I Picollo, M. A. (2008). Relative Contribution of Monooxygenase and Esterase to Pyrethroid Resistance in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *J. Med. Entomol*, **45**(2), 298-306.
- Sasabe, M., Wen, Z., Berenbaum, M. R., & Schuler, M. A. (2004). Molecular analysis of CYP321A1, a novel cytochrome P450 involved in metabolism of plant allelochemicals (furanocoumarins) and insecticides (cypermethrin) in *Helicoverpa zea*. *Gene*, **338**(2), 163-175.
- Schama, R., Pedrini, N., Juárez, M. P., ... Mesquita, R. D. (2016). *Rhodnius prolixus* supergene families of enzymes potentially associated with insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. doi:10.1016/j.ibmb.2015.06.005
- Scharf, M. E., Parimi, S., Meinke, L. J., Chandler, L. D., & Siegfried, B. D. (2001). Expression and induction of three family 4 cytochrome P450 (CYP4) genes identified from insecticide-resistant and susceptible western corn rootworms, *Diabrotica virgifera virgifera*. *Insect Molecular Biology*, **10**(2), 139-146.
- Scheller, R. H., Jackson, J. F., McAllister, L. B., Rothman, B. S., Mayeri, E., & Axel, R. (1983). A single gene encodes multiple neuropeptides mediating a stereotyped behavior. *Cell*, **32**(1), 7-22.
- Scheller, R. H., Kaldany, R. R., Kreiner, T., ... Taussig, R. (1984). Neuropeptides: mediators of behavior in *Aplysia*. *Science*, **225**(4668), 1300.
- Scheller, R. H., & Kirk, M. D. (1987). Neuropeptides in identified *Aplysia* neurons: precursor structure, biosynthesis and physiological actions. *Trends in Neurosciences*, **10**(1), 46-52.

- Scherkenbeck, J., & Zdobinsky, T. (2009). Insect neuropeptides: Structures, chemical modifications and potential for insect control. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **17**(12), 4071-4084.
- Schmidt, C. H., & Labrecque, G. C. (1959). Acceptability and Toxicity of Poisoned Baits to House Flies Resistant to Organophosphorus Insecticides. *Journal of Economic Entomology*, **52**(2), 345-346.
- Schofield, C. J., & Galvão, C. (2009). Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica*, **110**(2-3), 88-110.
- Schwarz, A., Medrano-Mercado, N., Schaub, G. A., ... Ribeiro, J. M. C. (2014). An Updated Insight into the Sialotranscriptome of *Triatoma infestans*: Developmental Stage and Geographic Variations. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **8**(12), e3372.
- Scott, J. G. (1990). Investigating Mechanisms of Insecticide Resistance: Methods, Strategies, and Pitfalls. En R. T. Roush & B. E. Tabashnik, eds., *Pesticide Resistance in Arthropods*, Boston, MA: Springer US, pp. 39-57.
- Scott, J. G., Michel, K., Bartholomay, L. C., ... Douglas, A. E. (2013). Towards the elements of successful insect RNAi. *Journal of Insect Physiology*, **59**(12), 1212-1221.
- Sedra, L., Haddad, A. S., & Lange, A. B. (2015). Myoinhibitors controlling oviduct contraction within the female blood-gorging insect, *Rhodnius prolixus*. *General and Comparative Endocrinology*, **211**, 62-68.
- Shaik, K. S., Pabst, M., Schwarz, H., Altmann, F., & Moussian, B. (2011). The Alg5 ortholog Wollknäuel is essential for correct epidermal differentiation during *Drosophila* late embryogenesis. *Glycobiology*, **21**(6), 743-756.
- Shang, Q., Pan, Y., Fang, K., ... Cao, C. (2014). Extensive Ace2 duplication and multiple mutations on Ace1 and Ace2 are related with high level of organophosphates resistance in *Aphis gossypii*. *Environmental Toxicology*, **29**(5), 526-533.
- Shi, H., Pei, L., Gu, S., ... Li, B. (2012). Glutathione S-transferase (GST) genes in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and comparative analysis with five additional insects. *Genomics*, **100**(5), 327-335.
- Shi, T., Burton, S., Wang, Y., Xu, S., Zhang, W., & Yu, L. (2018). Metabolomic analysis of honey bee, *Apis mellifera* L. response to thiacloprid. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **152**, 17-23.
- Shigenaga, M. K., Hagen, T. M., & Ames, B. N. (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **91**(23), 10771.
- Sierra, I. (2018). Estudios moleculares de la resistencia a insecticidas en triatominos. Universidad Nacional de La Plata.
- Sierra, I., Capriotti, N., Fronza, G., Mougabure-Cueto, G., & Ons, S. (2016). *Kdr* mutations in *Triatoma infestans* from the Gran Chaco are distributed in two differentiated foci: Implications for pyrethroid resistance management. *Acta Tropica*, **158**, 208-213.
- Sievers, F., & Higgins, D. G. (2014). Clustal Omega, Accurate Alignment of Very Large Numbers of Sequences. En D. J. Russell, ed., *Multiple Sequence Alignment Methods*, Totowa, NJ: Humana Press, pp. 105-116.
- Silva, A. X., Jander, G., Samaniego, H., Ramsey, J. S., & Figueroa, C. C. (2012). Insecticide resistance mechanisms in the green peach aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) I: A transcriptomic survey. *PLoS ONE*, **7**(6), e36366.

- Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V., & Zdobnov, E. M. (2015). BUSCO: Assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, **31**(19), 3210-3212.
- Sinka, R., Gillingham, A. K., Kondylis, V., & Munro, S. (2008). Golgi coiled-coil proteins contain multiple binding sites for Rabfamily G proteins. *Journal of Cell Biology*, **183**(4), 607-615.
- Soderlund, D. M. (2008). Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels. *Pest Management Science*, **64**, 610-616.
- Spillmann, C., Burrone, S., & Coto, H. (2013). Análisis de la situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en Argentina: avances en el control, 2012. *Rev Arg Salud Públ*, **4**(15).
- Stay, B., & Tobe, S. S. (2006). The Role of Allatostatins in Juvenile Hormone Synthesis in Insects and Crustaceans. *Annual Review of Entomology*, **52**(1), 277-299.
- Sterkel, M., Urlaub, H., Rivera-Pomar, R., & Ons, S. (2011). Functional Proteomics of Neuropeptidome Dynamics during the Feeding Process of *Rhodnius prolixus*. *Journal of Proteome Research*, **10**(8), 3363-3371.
- Strycharz, J. P., Lao, A., Li, H., ... Clark, J. M. (2013). Resistance in the highly DDT-resistant 91-R strain of *Drosophila melanogaster* involves decreased penetration, increased metabolism, and direct excretion. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **107**(2), 207-217.
- Sultan, M., Schulz, M. H., Richard, H., ... Yaspo, M. L. (2008). A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. *Science*, **321**, 956-960.
- Sun, L., Ye, Y., Sun, H., ... Zhu, C. (2013). Identification of Proteasome Subunit Beta Type 6 (PSMB6) Associated with Deltamethrin Resistance in Mosquitoes by Proteomic and Bioassay Analyses. *PLoS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0065859
- Syvanen, M., Zhou, Z., Wharton, J., Goldsbury, C., & Clark, A. (1996). Heterogeneity of the glutathione transferase genes encoding enzymes responsible for insecticide degradation in the housefly. *Journal of Molecular Evolution*, **43**(3), 236-240.
- Taghert, P. H. (1999). FMRFamide neuropeptides and neuropeptide-associated enzymes in *Drosophila*. *Microscopy Research and Technique*, **45**(2), 80-95.
- Tanaka, Y., Suetsugu, Y., Yamamoto, K., Noda, H., & Shinoda, T. (2014). Transcriptome analysis of neuropeptides and G-protein coupled receptors (GPCRs) for neuropeptides in the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *Peptides*, **53**, 125-133.
- Te Brugge, V. ., & Orchard, I. (2002). Evidence for CRF-like and kinin-like peptides as neurohormones in the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. *Peptides*, **23**(11), 1967-1979.
- Te Brugge, V. A., Lombardi, V. C., Schooley, D. A., & Orchard, I. (2005). Presence and activity of a Dippu-DH31-like peptide in the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. *Peptides*, **26**(1), 29-42.
- Te Brugge, V., Ianowski, J. P., & Orchard, I. (2009). Biological activity of diuretic factors on the anterior midgut of the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. *General and Comparative Endocrinology*, **162**(1), 105-112.
- Te Brugge, V., Paluzzi, J.-P., Schooley, D. A., & Orchard, I. (2011). Identification of the elusive peptidergic diuretic hormone in the blood-feeding bug *Rhodnius prolixus*: a CRF-related peptide. *The Journal of Experimental Biology*, **214**(3), 371.

Thamthiankul, S., Moar, W. J., Miller, M. E., & Panbangred, W. (2004). Improving the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* against *Spodoptera exigua* by chromosomal expression of a chitinase gene. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **65**(2), 183-192.

The Gene Ontology Consortium. (2017). Expansion of the Gene Ontology knowledgebase and resources. *Nucleic Acids Research*, **45**(D1), D331-D338.

The UniProt Consortium. (2018). UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, **46**(5), 2699.

Thornton, J. W., & Desalle, R. (2000). Gene family evolution and homology: Genomics Meets Phylogenetics. *Annu Rev Genomics Hum Genet.*, **1**, 41-73.

Thurmond, J., Goodman, J. L., Strelets, V. B., ... Consortium, the F. (2019). FlyBase 2.0: the next generation. *Nucleic Acids Research*, **47**(D1), D759-D765.

Tipping, M., Kim, Y., Kyriakakis, P., Tong, M., Shvartsman, S. Y., & Veraksa, A. (2010). β -arrestin Kurtz inhibits MAPK and Toll signalling in *Drosophila* development. *The EMBO Journal*, **29**(19), 3222.

Toba, G., & Aigaki, T. (2000). Disruption of the Microsomal glutathione S-transferase-like gene reduces life span of *Drosophila melanogaster*. *Gene*, **253**(2), 179-187.

Tolosa, A. C., Germano, M., Cueto, G. M., Vassena, C., Zerba, E., & Picollo, M. I. (2008). Differential Patterns of Insecticide Resistance in Eggs and First Instars of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *Journal of Medical Entomology*, **45**(3), 421-426.

Tonning, A., Helms, S., Schwarz, H., Uv, A. E., & Moussian, B. (2006). Hormonal regulation of mummy is needed for apical extracellularmatrix formation and epithelial morphogenesis in *Drosophila*. *Development*, **133**(2), 331.

Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., ... Pachter, L. (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols*, **7**, 562.

Traverso, L., Lavore, A., Sierra, I., ... Rivera-Pomar, R. V. (2017). Comparative and functional triatomine genomics reveals reductions and expansions in insecticide resistance-related gene families. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **11**(2), e0005313.

Traverso, L., Sierra, I., Sterkel, M., Francini, F., & Ons, S. (2016). Neuropeptidomics in *Triatoma infestans*. Comparative transcriptomic analysis among triatomines. *Journal of Physiology Paris*. doi:10.1016/j.jphysparis.2016.12.005

Tyler, K. M., & Engman, D. M. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*, **31**(5-6), 472-481.

Vafopoulou, X., & Steel, C. (2014). Synergistic induction of the clock protein PERIOD by insulin-like peptide and prothoracicotrophic hormone in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera): implications for convergence of hormone signaling pathways. *Frontiers in Physiology*, **5**, 41.

Vafopoulou, X., Steel, C. G. H., & Terry, K. L. (2007). Neuroanatomical relations of prothoracicotrophic hormone neurons with the circadian timekeeping system in the brain of larval and adult *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *Journal of Comparative Neurology*, **503**(4), 511-524.

Valenzuela-Miranda, D., & Gallardo-Escárate, C. (2016). *Caligus rogercresseyi* serine proteases: Transcriptomic analysis in response to delousing drugs treatments. *Aquaculture*, **465**, 65-77.

van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., & Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in Genetics*, **30**(9), 418-426.

- Vanden Broeck, J. (2001). Insect G protein-coupled receptors and signal transduction. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. doi:10.1002/arch.1054
- Vassena, C. V., Picollo, M. I., & Zerba, E. N. (2000). Insecticide resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. *Medical and Veterinary Entomology*. doi:10.1046/j.1365-2915.2000.00203.x
- Vazquez-Prokopec, G. M., Spillmann, C., Zaidenberg, M., Kitron, U., & Gürtler, R. E. (2009). Cost-effectiveness of Chagas disease vector control strategies in Northwestern Argentina. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. doi:10.1371/journal.pntd.0000363
- Veenstra, J. A. (2000). Mono- and dibasic proteolytic cleavage sites in insect neuroendocrine peptide precursors. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **43**(2), 49-63.
- Veenstra, J. A. (2016). Allatostatins C, double C and triple C, the result of a local gene triplication in an ancestral arthropod. *General and Comparative Endocrinology*, **230-231**, 153-157.
- Verlinden, H., Vleugels, R., Zels, S., ... Vanden Broeck, J. (2014). Receptors for Neuronal or Endocrine Signalling Molecules as Potential Targets for the Control of Insect Pests. *Advances in Insect Physiology*, **46**, 167-303.
- Villalobos-Sambucaro, M. J., Lorenzo-Figueiras, A. N., Riccillo, F. L., Diambra, L. A., Noriega, F. G., & Ronderos, J. R. (2015). Allatotropin Modulates Myostimulatory and Cardioacceleratory Activities in *Rhodnius prolixus* (Stål). *PLOS ONE*, **10**(4), e0124131-.
- Vogel, H., & Wheat, C. W. (2011). Accessing the Transcriptome: How to Normalize mRNA Pools. En V. Orgogozo & M. V. Rockman, eds., *Molecular Methods for Evolutionary Genetics*, London: Humana Press, pp. 105-128.
- Vontas, J. G., Small, G. J., & Hemingway, J. (2000). Comparison of esterase gene amplification, gene expression and esterase activity in insecticide susceptible and resistant strains of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål). *Insect Molecular Biology*, **9**(6), 655-660.
- Vontas, J. G., Small, G. J., & Hemingway, J. (2001). Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochemical Journal*, **357**(1), 65-72.
- Vontas, J. G., Small, G. J., Nikou, D. C., Ranson, H., & Hemingway, J. (2002). Purification, molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Biochem. J.*, **362**, 329-337.
- Wagner, G. P., Kin, K., & Lynch, V. J. (2012). Measurement of mRNA abundance using RNA-seq data: RPKM measure is inconsistent among samples. *Theory in Biosciences*, **131**(4), 281-285.
- Wan, P.-J., Shi, X.-Q., Kong, Y., ... Li, G.-Q. (2013). Identification of cytochrome P450 monooxygenase genes and their expression profiles in cyhalothrin-treated Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **107**(3), 360-368.
- Wang, J., Vasaiakar, S., Shi, Z., Greer, M., & Zhang, B. (2017a). WebGestalt 2017: a more comprehensive, powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit. *Nucleic Acids Research*, **45**(W1), W130-W137.
- Wang, Y., Zhang, H., Shi, M., Liou, Y. C., Lu, L., & Yu, F. (2017b). Sec71 functions as a GEF for the small GTPase Arf1 to govern dendrite pruning of Drosophila sensory neurons. *Development*, **144**(10), 1851-1862.

- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*, **10**(1), 57-63.
- War, A. R., Paulraj, M. G., Ahmad, T., ... Sharma, H. C. (2012). Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signaling & Behavior*, **7**(10), 1306-1320.
- Warren, J. T., Petryk, A., Marqués, G., ... Gilbert, L. I. (2004). Phantom encodes the 25-hydroxylase of *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*: a P450 enzyme critical in ecdysone biosynthesis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **34**(9), 991-1010.
- Waterhouse, P. M., Wang, M.-B., & Lough, T. (2001). Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature*, **411**, 834.
- Waterhouse, R. M., Seppey, M., Simão, F. A., ... Zdobnov, E. M. (2017). BUSCO Applications from Quality Assessments to Gene Prediction and Phylogenomics. *Molecular Biology and Evolution*, **35**(3), 543-548.
- Wegener, C., & Gorbashov, A. (2008). Molecular evolution of neuropeptides in the genus *Drosophila*. *Genome Biology*, **9**, R131.
- Whangbo, J. S., & Hunter, C. P. (2008). Environmental RNA interference. *Trends in Genetics*. doi:10.1016/j.tig.2008.03.007
- Whyard, S., Downe, A., & Walker, V. (1995). Characterization of a novel esterase conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex tarsalis*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **29**(4), 329-342.
- Wigglesworth, V. B. (1934). The Physiology of Ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). II. Factors controlling Moulting and 'Metamorphosis'. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, **s2-77**(306), 191.
- Wigglesworth, V. B. (1939). The Principles of Insect Physiology. *Proceedings of the Royal Entomological Society of London. Series A, General Entomology*, **14**(7-8), 100.
- Wigglesworth, V. B. (1953). The origin of sensory neurons in an insect. *Quart. J. Micr. Soc.*, **94**, 93-112.
- Wigglesworth, V. B. (1954). *The physiology of insect metamorphosis*. (M. Abercrombie, P. M. Medawar, G. Salt, M. M. Swann, & V. B. Wigglesworth, Eds.), London: The Syndics of the Cambridge University Press.
- Wigglesworth, V. B. (1959). *The control of growth and form*, New York: Cornell University Press.
- Wigglesworth, V. B. (1964). The Hormonal Regulation of Growth and Reproduction in Insects. *Advances in Insect Physiology*, **2**, 247-336.
- Wilding, C. S., Weetman, D., Rippon, E. J., ... Donnelly, M. J. (2014). Parallel evolution or purifying selection, not introgression, explains similarity in the pyrethroid detoxification linked GSTE4 of *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*. *Molecular Genetics and Genomics*. doi:10.1007/s00438-014-0910-9
- Wilkins, R. M. (2017). Insecticide resistance and intracellular proteases. *Pest Management Science*, **73**, 2403-2412.
- Williamson, M. S., Martinez-Torres, D., Hick, C. A., & Devonshire, A. L. (1996). Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides. *Molecular and General Genetics MGG*, **252**(1), 51-60.

- Wu, Y. Y., Luo, Q. H., Hou, C. S., ... Diao, Q. Y. (2017). Sublethal effects of imidacloprid on targeting muscle and ribosomal protein related genes in the honey bee *Apis mellifera* L. *Scientific Reports*. doi:10.1038/s41598-017-16245-0
- Wulff, J. P., Capriotti, N., & Ons, S. (2018). Orcokinin regulate the expression of neuropeptide precursor genes related to ecdysis in the hemimetabolous insect *Rhodnius prolixus*. *Journal of Insect Physiology*, **108**, 31-39.
- Wulff, J. P., Sierra, I., Sterkel, M., ... Ons, S. (2017). Orcokinin neuropeptides regulate ecdysis in the hemimetabolous insect *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **81**, 91-102.
- Xiong, C., Fang, F., Chen, L., ... Zhu, C. (2014). Trypsin-catalyzed deltamethrin degradation. *PLoS ONE*, **9**(3), e89517.
- Yamamoto, K., Nagaoka, S., Banno, Y., & Aso, Y. (2009). Biochemical properties of an omega-class glutathione S-transferase of the silkworm, *Bombyx mori*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP*, **149**(4), 461-467.
- Yamamoto, K., Teshiba, S., Shigeoka, Y., ... Katakura, Y. (2011). Characterization of an omega-class glutathione S-transferase in the stress response of the silkworm. *Insect Molecular Biology*, **20**(3), 379-386.
- Yang, Q., Zhou, D., Sun, L., ... Zhu, C. (2008). Expression and characterization of two pesticide resistance-associated serine protease genes (NYD-tr and NYD-ch) from *Culex pipiens pallens* for metabolism of deltamethrin. *Parasitology Research*, **103**, 507-516.
- Yang, Y., Gehrke, S., Haque, M. E., ... Lu, B. (2005). Inactivation of *Drosophila* DJ-1 leads to impairments of oxidative stress response and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**(38), 13670.
- Yang, Y., Nachman, R. J., & Pietranonio, P. V. (2015). Molecular and pharmacological characterization of the Chelicerata pyrokinin receptor from the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **60**, 13-23.
- Yang, Y., Zhang, Y., Yang, B., Fang, J., & Liu, Z. (2016). Transcriptomic responses to different doses of cycloxaprid involved in detoxification and stress response in the whitebacked planthopper, *Sogatella furcifera*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **158**(3), 248-257.
- Younus, F., Chertemps, T., Pearce, S. L., ... Oakeshott, J. G. (2014). Identification of candidate odorant degrading gene/enzyme systems in the antennal transcriptome of *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **53**, 30-43.
- Yuan, C., Ding, X., Xia, L., Yin, J., Huang, S., & Huang, F. (2011). Proteomic analysis of BBMV in *Helicoverpa armigera* midgut with and without Cry1Ac toxin treatment. *Biocontrol Science and Technology*, **21**(2), 139-151.
- Zaluski, R., Justulin, L. A., & Orsi, R. de O. (2017). Field-relevant doses of the systemic insecticide fipronil and fungicide pyraclostrobin impair mandibular and hypopharyngeal glands in nurse honeybees (*Apis mellifera*). *Scientific Reports*, **7**(1), 15217.
- Zandawala, M., Hamoudi, Z., Lange, A. B., & Orchard, I. (2015). Adipokinetic hormone signalling system in the Chagas disease vector, *Rhodnius prolixus*. *Insect Molecular Biology*, **24**(2), 264-276.
- Zandawala, M., Lytvyn, Y., Taiakina, D., & Orchard, I. (2012). Cloning of the cDNA, localization, and physiological effects of FGLamide-related allatostatins in the blood-gorging bug, *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **42**(1), 10-21.

- Zandawala, M., & Orchard, I. (2013). Post-feeding physiology in *Rhodnius prolixus*: The possible role of FGLamide-related allatostatins. *General and Comparative Endocrinology*, **194**, 311-317.
- Zeledón, R., Ponce, C., & Méndez-Galván, J. F. (2007). Group discussion: epidemiological, social, and control determinants of Chagas disease in Central America and Mexico. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **102**(suppl 1), 45-46.
- Zerba, E. N. (1999). Susceptibility and resistance to insecticides of Chagas disease vectors. *Medicina*, **59**(2), 41-46.
- Zhang, J., Goyer, C., & Pelletier, Y. (2008). Environmental stresses induce the expression of putative glycine-rich insect cuticular protein genes in adult *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Molecular Biology*, **17**(3), 209-216.
- Zhou, C., Yang, H., Wang, Z., Long, G. Y., & Jin, D. C. (2018). Comparative transcriptome analysis of *Sogatella furcifera* (Horváth) exposed to different insecticides. *Scientific Reports*, **8**, 8773.
- Zhou, J. J., Field, L. M., & He, X. L. (2010). Insect odorant-binding proteins: Do they offer an alternative pest control strategy? *Outlooks on Pest Management*, **21**(1), 31-34.
- Zhou, X., Wheeler, M. M., Oi, F. M., & Scharf, M. E. (2008). RNA interference in the termite *Reticulitermes flavipes* through ingestion of double-stranded RNA. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **38**(8), 805-815.
- Zhu, Y.-C., Dowdy, A. K., & Baker, J. E. (1999). Detection of single-base substitution in an esterase gene and its linkage to malathion resistance in the parasitoid *Anisopteromalus calandrae* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Pesticide Science*, **55**(4), 398-404.
- Zitnan, D., & Adams, M. E. (2012). Neuroendocrine Regulation of Ecdysis. En *Insect Endocrinology*, Elsevier, pp. 253-309.
- Zuo, Y., Peng, X., Wang, K., Lin, F., Li, Y., & Chen, M. (2016). Expression patterns, mutation detection and RNA interference of *Rhopalosiphum padi* voltage-gated sodium channel genes. *Scientific Reports*. doi:10.1038/srep30166
- Zupanc, G. K. H. (1996). Peptidergic transmission: From morphological correlates to functional implications. *Micron*, **27**(1), 35-91.